Série A, N° 4605 N° d'ordre : 5452

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

LECADET Marguerite

1re THÈSE

Isolement et caractérisation de deux protéases des chenilles de *Pieris brassicae L.* et étude de leur action sur l'inclusion parasporale de *Bacillus thuringiensis*

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté

« STRUCTURE FONDAMENTALE ET BIOSYNTHÈSE DES PAROIS DE BACTÉRIES GRAM POSITIVES »

Soutenues le 23 octobre 1965 devant la Commission d'examen

MM. LEDERER *Président.*

CHAPEVILLE, DEDONDER } *Examinateurs.*

IMPRIME « AU MANUSCRIT », 10, RUE PAUL-BERT — ALFORT

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546825_0075

Série **A, N° 4605** N° d'ordre : **5452**

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

LECADET Marguerite

1re THÈSE

Isolement et caractérisation de deux protéases des chenilles de *Pieris brassicae L.* et étude de leur action sur l'inclusion parasporale de *Bacillus thuringiensis*

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté

« STRUCTURE FONDAMENTALE ET BIOSYNTHÈSE DES PAROIS DE BACTÉRIES GRAM POSITIVES »

Soutenues le 23 octobre 1965 devant la Commission d'examen

MM. LEDERER *Président.*

CHAPEVILLE, DEDONDER *Examinateurs.*

IMPRIME « AU MANUSCRIT », 10, RUE PAUL-BERT — ALFORT

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen : M. ZAMANSKY

BRELOT	T	Analyse supérieure
PRENANT	T	Anatomie et histologie comparée
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés
PREVOST	T	Chimie organique
WYART	T	Minérale & cristallo
TEISSIER	T	Zoologie
MANGENOT	T	Biologie végé (Orsay)
AUGER	T	Physique quantique et relativité
MONNIER	T	Physiologie générale
PIVETEAU	T	Paléontologie
ROCARD	T	Physique ENS
CARTAN	T	Mathématiques ENS
LAFFITTE	T	Chimie générale
N...	T	Géométrie supérieure
COULOMB	T	Physique du globe
COUSIN (Mlle)	T	Biologie animale SPCN
CHRETIEN	T	Chimie minérale
BOCQUET	T	Zoologie
KASTLER	T	Physique ENS
EPHRUSSI	T	Génétique
RIVIERE	T	Géologie SPCN et sédiment (Orsay)
GAUTHERET	T	Biologie végétale PCB
LUCAS R.	T	Recherches physiques
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire
ARNULF	T	Optique appliquée
MORAND	T	Physique enseignement
SOLEILLET	T	Physique PCB
FORTIER	T	Mécanique exp. des fluides
DRACH	T	Zoologie
QUENEY	T	Météo et dynamique atmos.
GALLIEN	T	Embryologie
EICHORN	T	Botanique
DE CUGNAC	T	Biologie végétale SPCN
CAUCHOIS (Mlle)	T	Chimie physique
THELLIER	T	Physique du globe
L'HERITIER	T	Biologie générale (Orsay)
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay)
PONCIN	T	Mécanique générale
DU BREIL	T	Arith. et théorie des nombres
QUELET	T	Chimie organique
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T	Micropaléontologie
JUNG	T	Géologie
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction élec.
WIEMANN	T	Chimie organique et struc.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste (Orsay)
VASSY	T	Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES	T	Théorie physique
AMIEL	T	Chimie générale
HOCART	T	Minérall et cristal
MATHIEU J-P.	T	Physique optique
COUTEAUX	T	Cytologie
MAY	T	Zoologie
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et topologie
FELDMANN	T	Biologie végétale marine
GUINIER	T	Physique des solides (Orsay)
JOST	T	Physiologie comparée
FORTET	T	Calcul des probabilités et physique mathématiques
SCHWARTZ	T	Calcul dif. et intégral
CHOUARD	T	Physiologie végétale
MALAVARD	T	Aviation (technique aéronautique
NOMANT	T	Synthèse organique
BENARD	T	Chimie minérale
BUVAT	T	Botanique ENS
DUGUE	T	Statistique mathématiques
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
ULRICH	T	Physiologie végét. appliquée
MARECHAL	T	Optique théo et appli.
KIRRMANN	T	Théories chimiques
CHADEFAUD	T	Botanique
LE BRETON (Mlle)	T	Physio de la nutrition
LELONG	T	Appli de l'anat. à la géométrie
DEVILLERS	T	Anatomie et histo. comparée
EHRESMANN	T	Topologie algébrique
FRANCON	T	Physique SPCN
GLANGEAUD	T	Géo. phys. et géol.
DODEMENT	T	Mathématiques MGP
PISOT	T	Technique math. de la physique
ROCH	T	Géologie
SCHATZMANN	T	Astrophysique
TERMIER	T	Géologie générale
ZAMANSKY	T	Mathématiques génér.
LENNUIER	T	Physique MGP
RIZET	T	Génétique Orsay
ROUTHIER	T	Géologie appliquée
TONNELAT (Mme)	T	Physique théorique
DIXMIER	T	Mathématiques MPC
SOUCHAY	T	Chimie générale
AIGRAIN	T	Electrotech. génér.
BRUSSET	T	Chimie systématique
LEVY M.	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
CHAIX (Mme)	T	Chimie biologique

HUREL PY (Mme)	T	Biologie végétale PCB
PANNETIER	T	Chimie générale
BRUN	T	Mécanique des fluides I
LEDERER	T	Chimie biologique (Orsay)
DUBREIL (Mme)	T	Mathématiques (agrégation)
LELONG (Mme)	T	Math II ENS
BELLAIR	T	Géologie SPCN
COTTE	T	Physique électricité
DUBOIS J.-E.	T	Chimie organique
LAMOTTE	T	Zoologie ENS
MICHEL A.	T	Chimie minérale (Orsay)
OLMER	T	Énergétique générale
ROUAULT	T	Electricité (Orsay)
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée
BARCHEWITZ	T	Chimie physique
BROSSEL	T	Physique atomique
BUSER	T	Physiologie comparée
CAMUS	T	Physio. végétale
CASTAING	T	Physique II thermo (Orsay)
CURIEN	T	Minéralo et cristal.
MOYSE	T	Physio végét. (Orsay)
CHARNIAUX-COTTON (Mme)	T	Evolution des êtres organisés
POSSOMPES	T	Zoologie
PULLMANN	T	Chimie quantique
TEILLAC	T	Physique nuc. et radioactivité (Orsay)
TONNELAT	T	Bio physico chim (Orsay)
VILLE	T	Econométrie
WILLEMART	T	Chimie PCB
DODE	T	Chimie (Orsay)
FREYMANN	T	Recherches physiques
GUINOCHET	T	Biolo végét. SPCN (Orsay)
ROLLET	T	Chimie minérale
JOSIEN (Mlle)	T	Chimie SPCN
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes
ARNOULT	T	Electronique (Orsay)
CHAPELLE	T	Physique I (Orsay)
DELANGE	T	Mathématiques I (Orsay)
DENY	T	Math. génér. (Orsay)
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides
LUCAS	T	Géologie
ALLARD	T	Chimie physique
BERTHELOT	T	Physique des partic. fondament. (Orsay)
BRICARD	T	Météor. et phys. de l'at.
ALBE FESSARD (Mme)	T	Psycho physio
FRIEDEL	T	Physique des solides (Orsay)
JULIA M.	T	Etudes des moléculaires complexes
LENDER	T	Biologie animale SPCN (Orsay)
MAGAT	T	Physico chimie des radio-éléments
QUINTIN (Mlle)	T	Electrochimie
MONOD	T	Chimie du métabolisme
BENOIT	T	Physio animale Orsay
DE POSEEL	T	Analyse numérique
CHARLOT	T	Chimie analytique
LEMEE	T	Ecologie végétale Orsay
GUERIN	T	Chimie MPC Orsay
CHATELET	T	Chimie PCB
JEAN	T	Physio nucléaire Orsay
MATTLER	T	Physique SPCN
BERGERARD	T	Zoologie Orsay
BERTEIN	T	Electronique Orsay
BOUISSIERES	T	Radiochimie
COUTURE (Mme)	T	Thermo et méca physique
ELLEMBERGER	T	Géologie des grandes régions du globe (Orsay)
FRANC	T	Biologie animale PCB
SCHNELL		Botanique tropicale
STLKOWSKI	T	Physiologie végétale
ACHER	T	Chimie biologique
BAUDOIN	T	Biologie animale PCB
BEAUMONT		Biologie animale SPCN
BLAMONT		Géophysique ionosphère
BOUREAU	T	Botanique
CURIE D.		Physique MGP
DURAND DELGA	T	Géologie
FREON	T	Chimie organique Orsay
HELLER	T	Physiologie végétale
TORTRAT	T	Calcul des probabilités
CAILLEUX	T	Géologie SPCN
MAGNAN		Physique électricité
DAUDEL	T	Mécanique ondulat. appli à la chimie théo et à la phy nucléaire
FOURCROY (Mlle)		Biologie végétale SPCN
CHOQUET-BRUHAT (Mme).		Mécanique analytique et méca céleste
VEIL (Mlle)	T	Physiologie générale
LWOFF	T	Microbiologie
SIESTRUNCK	T	Méca phys et expérimentale
LACOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay)
BROCHARD	T	Physique PCB Orsay
CABANNES	T	Mécanique générale
LESIEUR	T	Math I (Orsay)
MAZET	T	Méca géné (Orsay)
CAIRE		Géogra. physique et géo dynami-
COMOLET		Méca. des fluides
CORABŒUF	T	Physio animale Orsay
DELLOUE	T	Physique de l'exosphère
GORENFLOT		Botanique II (Orsay)
HOUILLON		Biologie animale PCB
JULLIEN J.		Chimie SPCN Orsay
MALGRANGE	T	Technique mathé de la phys. Ors.
OLIVIER		Anthropologie
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay)
BLANC-LAPIERRE	T	Physique ENS (Orsay)
CHEVAUGEON	T	Botanique (Orsay)
KAHANE	T	Mathématiques Orsay
SAMUEL	T	Math. ENS féminines
KOURGANOFF	T	Astronomie (Orsay)

THIRY	T	Méca céleste
ABELES		Physique SPCN
AMAT	T	Physique PCB
AUBOIN	T	Géologie
BENOIT-GUEUTAL (Mme)	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay)
BOUGIS		Biologie marine Villefranche-s.-Mer
BRUHAT	T	Math MPC
BRUNN	T	Géologie historique (Orsay)
CHABBAL	T	Physique MGP Orsay
DEHEUVELS	T	Math propé
D'ESPAGNAT	T	Physique théorique (Orsay)
FURON	T	Géologie SPCN
GANS (Mme)	T	Génétique
GENEVES		Biologie végétale PCB
GUILBERT		Physique CUS Orléans
HUPE	T	Pétrographie
HOLLANDE	T	Biolo géné
LIONS	T	Analyse numérique
MAITTE	T	Chimie PCB
MEYER		Physique propé
NICOLAS		Géologie appliquée
PANIGEL		Biologie générale
RAVIER		Pétrographie
ROSEAU	T	Méca théorique des fluides
ROUBINE		Electronique
SILBER	T	Chimie PCB
UEBERSFELD	T	Electronique
YVON	T	Théories physiques
HERVE	T	Mathématiques
NERON	T	Math MPC (Orsay)
PECKER-WIMEL (Mme)	T	Astrophysique
BALKANSKY		Physique MPC
LE CORRE	T	Electricité
DELCROIX	T	Physique théorique (Orsay)
GOURDIN		Physique théorique (Orsay) des hautes énergies
LEHMANN	T	Phys exp des hautes énergies
NATAF	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay)
ECHALIER		Biologie animale PCB
BARRAUD		Physiolo cellulaire
LIORET		Physiologie végé (Orsay)
DARS		Géologie structurale et géolo appli
CAMEFORT	T	Botanique, agrégation
VICHNIEWSKY	T	Mécanique industrielle
BLAQUIERE		Electronique (Orsay)
ARNOUS	T	Physique théorique
TATIBOUET		Chimie (CSU Orléans)
MALLITZIN	T	Math propé (Orsay)
GAUDEMAR		Chimie propé
PEREZ Y JORBA		Physique Expéri des Hautes énergies (Orsay)
DAVID	T	Chimie (agrégation Orsay)
BROUSSE	T	Mécanique théorique
ROSCH	T	Astronomie
GUY	T	Physique expérimentale
LAZARD		Math MPC
MOREL Pierre		Physique MPC
ARSAC		Programmation
LEFEBVRE		Chimie MPC
CHAPEVILLE		Biochimie
BENOIT		Physique CPEM
RIO		Chimie CPEM
JAUZEIN		Géologie ENS
PREVOST Georges		BV CPEM
FAVARD P.		BA CPEM
VILKAS		Chimie CPEM
FICINI (Mlle)		Chimie CPEM
LEQUEUX		Astronomie
COHEN TANNOUDJI		Physique MPC
TAVERNIER		Physique CPEM
ROIZEN (Mme)		Physique CPEM
DURAND M.		BA SPCN
PASCAUD		Physiologie
PETIT (Mme)		BA CPEM
BROUSSE		Géologie Orsay
CAGNIAC		Physique (agrégation Orsay)
LEBERRE		Zoologie (Orsay)
SCHAEFFER		Microbiologie (Orsay)
de GENNES		Physique des solides (Orsay)
RIOU		Physique nuclé exp (Orsay)
CLAUSER		Chimie biolo (Orsay)
CHEVALIER		Physio animale Orsay
JANCOVICI		Physique atomique (Orsay)
FALK-VAIRANT		Physique nucléaire (Orsay)
FETIZON		Chimie propé (Orsay)
CERF		Mathématiques Orsay
LURCAT		Physique
RIGAUDY		Chimie SPCN
SIGWALT		Chimie SPCN
FOURNET		Electricité générale
COLLONGUES		Chimie CPEN
DUBERT		Biochimie
LAVOREL		Biologie physico chimique
MOREL F.		Physiologie comparée
TALBOT		Génétique chimique
NOUGAREDE (Mme)		Botanique
FRANÇOIS		Zoologie
IVANOFF		Océanographie phys.
CADIOT		Chimie organique
BARUCH		Physique propédeutique
NOZIERES		Physique générale
BOK		Physique propédeutique
SLONIMSKI		Génétique

Le Secrétaire Général :

R. POULAIN.

A LA MEMOIRE DE MES PARENTS

A MES FRERE ET SŒURS

A Mme le Docteur FAVIER-BRUNET

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Cette thèse a été préparée à l'Institut Pasteur où il m'a été donné de bénéficier d'une exceptionnelle atmosphère de travail : qu'il me soit permis d'exprimer ma respectueuse gratitude à M. le Professeur Trefouel, Président de l'Académie des Sciences, Directeur honoraire de l'Institut Pasteur, ainsi qu'à M. le Professeur Gernez-Rieux, Directeur de l'Institut Pasteur.

Ma reconnaissance s'adresse également à M. le Professeur Lemoigne, Membre de l'Institut, qui m'accueillit dans le Service des Fermentations et qui a suivi ce travail avec un intérêt bienveillant.

Je tiens à remercier tout spécialement M. Norbert Grelet, Professeur à la Faculté des Sciences de Reims, qui m'initia à la recherche et m'en fit entrevoir toutes les exigences ; ses conseils et la rigueur de son jugement m'ont profondément marquée.

Je désire exprimer toute ma gratitude à Mme Elisabeth Work avec qui je travaillai quelques mois et qui contribua beaucoup à ma formation scientifique.

Le travail exposé dans ce mémoire a été effectué sous la direction de M. Raymond Dedonder, Chef de service à l'Institut Pasteur, Directeur de Recherches au C.N.R.S., qui me confia ce sujet. La largeur de ses vues, l'appui de ses encouragements et de son expérience, l'intérêt constant qu'il manifesta pour cette question me furent très précieux, et je ne saurai assez lui exprimer ma profonde gratitude.

Je prie M. le Professeur Lederer, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse, de trouver ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance.

Je remercie également M. François Chapeville, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences, qui a bien voulu accepter d'examiner ce travail.

Je me dois de remercier M. Antoine Bonnefoi, Chef du Service des vaccins à l'Institut Pasteur, qui est à l'origine du développement de ces questions et qui en facilita la réalisation pratique. Celle-ci a pu être effectuée, grâce à la participation de M. Pierre Grison, Directeur de la Station de Lutte biologique et de Biocénotique de La Minière (I.N.R.A.) et de ses collaborateurs, en particulier de M. Daniel Martouret, Chargé de Recherches : qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de ma très vive gratitude.

Enfin je ne saurais oublier mes Collègues de l'Institut Pasteur qui, par leurs conseils et leurs critiques amicales, m'ont efficacement aidée. Mes remerciements s'adressent particulièrement à Mlle G. Chevrier, dont la collaboration technique me fut précieuse.

INTRODUCTION ET HISTORIQUE

Bacillus thuringiensis est une bactérie pathogène de certains lépidoptères, qui se distingue de *B. cereus* par la propriété de former au cours de la sporulation une inclusion de forme bipyramidale, visible en microscopie optique et appelée « cristal » dans la littérature (74). (Fig. 1).

Figure 1

Formation du cristal de B. thuringiensis au cours de la sporulation (*)

(*) Les clichés présentés dans le texte ont été réalisés au Service de Microphotographie de l'Institut Pasteur, que nous tenons à remercier.

Cet élément figuré, qui est une protéine cristalline, est responsable de la pathogénicité de *B. thuringiensis* pour les larves de certains lépidoptères (notamment : *Pieris brassicae, Bombyx mori,* etc.) et manifeste son pouvoir pathogène lorsqu'il est administré aux larves par la seule voie orale. Le cristal de *B. thuringiensis* ne serait donc toxique qu'après avoir été dégradé au cours de la digestion selon un processus de nature enzymatique, d'où l'idée de protoxine émise à ce sujet (7).

Cette hypothèse : cristal = protoxine est à l'origine de l'intérêt que nous avons porté à cette question et, de ce fait, le but initial du travail que nous allons décrire fut l'étude de l'hydrolyse enzymatique du cristal de *B. thuringiensis* par le chyle ou plus exactement par les protéases de *Pieris brassicae.*

C'est donc dans le domaine de la protéolyse que l'on peut situer cette étude dont l'aspect le plus marquant est de mettre en jeu une protéine cristalline, molécule de dimensions géantes, voisines de celle de la spore, et des enzymes d'origine assez particulière puisqu'il s'agit de protéases d'insectes.

Avant d'exposer de manière plus détaillée les grandes lignes de ce travail, il convient de mieux définir la relation entre le substrat considéré : le cristal de *B. thuringiensis* et les enzymes d'hydrolyse : les protéases de *Pieris brassicae,* ce qui nous permettra de mettre en évidence les raisons qui ont motivé le choix de ces protéases.

Tout d'abord, qu'est ce *B. thuringiensis ?* Quelle est l'origine de cette notion de cristal protoxine ?

I. — ÉTAT DES TRAVAUX ANTÉRIEURS SUR LE CRISTAL DE B. THURINGIENSIS

Les premières observations de cette bactérie furent réalisées en 1911 par Berliner (20) qui isola d'une larve de *Ephestia kuniella* (papillon trouvé dans les farines avariées) un bacille sporulé porteur d'un corps rhomboïde (qu'il appela « Retskorper ») auquel il donna le nom de *B. thuringiensis* (21). Ces observations furent confirmées en 1927 par Mattes (117), puis par Smith et coll. (157) ; ces auteurs considèrent *B. thuringiensis* comme voisin de *B. cereus* dont il diffère seulement par la présence de l'inclusion cristalline et par la pathogénicité pour les insectes. En 1951, Steinhaus (166) attire l'attention sur la pathogénicité de *B. thuringiensis* pour la chenille parasite de la luzerne (Colia). Deux ans plus tard, Hannay (74) redécouvre le « Retskorper » et mentionne que les spores sont toujours accompagnées de ce corps bipyramidal auquel il donne le nom de cristal. Les travaux de ces deux derniers auteurs (167) aboutissent à la conclusion que formation du cristal et pathogénicité sont les caractéristiques générales de

B. thuringiensis et que la présence de l'inclusion parasporale pourrait être liée à la pathogénicité.

C'est alors que Angus (4), travaillant sur *B. sotto* (qui est l'équivalent japonais de la souche étudiée par Berliner), associe définitivement la présence des cristaux à la pathogénicité de *B. thuringiensis* pour les insectes. Cet auteur montre que des cultures totales en fin de sporulation, ou des extraits obtenus après dissolution alcaline des cristaux, provoquent les mêmes symptômes d'intoxication lorsqu'ils sont administrés oralement au ver à soie. Toujours, d'après Angus (4) (5), les symptômes de l'intoxication chez les chenilles de *Bombyx mori* qui ont ingéré des cultures de *B. thuringiensis* sont les suivants : profonde paralysie dans les premières heures suivant l'ingestion, puis léthargie et paralysie générale entraînant la mort.

Les conclusions tirées par cet auteur sont les suivantes (5) (6) :

1° seules les cultures sporulantes contenant les inclusions cristallines causent la paralysie des larves.

2° les cristaux seuls, ou leurs extraits alcalins, produisent les symptômes décrits.

3° les spores seules ne sont pas toxiques.

4° la toxicité ne se manifeste qu'après administration par voie orale ; aucun symptôme de paralysie ne survient lorsque les cultures ou les cristaux sont administrés par injection.

Depuis ces dix dernières années, ce problème de la pathogénicité de *B. thuringiensis* a suscité de nombreux travaux.

Fitz-James et Toumanoff (50), puis Delaporte et Beguin (40) étudient la toxicité et les caractéristiques de différentes souches de *B. thuringiensis*. Une classification complète, d'après les critères biochimiques et sérologiques de 24 souches de *Bacillus* du type *thuringiensis* a été récemment mise au point par de Barjac et Bonnefoi (13).

Parmi les différentes études consacrées à *B. thuringiensis*, nous devons acorder une place prépondérante aux travaux de Hannay (74), Fitz-James (75) et Angus (7) qui nous ont fourni les données de base nécessaires à l'origine de ce travail. Ces auteurs ont en effet réalisé les premières études sur l'isolement et la composition chimique des cristaux dont ils ont montré la nature protéique. En 1955, Hannay et Fitz-James (75) réussissent à séparer les cristaux des spores qui les accompagnent (souche Berliner), par centrifugation différentielle. Ils montrent :

— que les cristaux contiennent entre 16 et 17 p. 100 d'azote,

— ne contiennent pas de phosphore,

— sont complètement solubilisés par la soude au-delà de pH 12,2 ; le spectre d'absorption de la solution alcaline ainsi obtenue est caractéristique des protéines, avec un maximum d'absorption à 280 mμ. Ces auteurs étudient enfin la structure cristalline

de l'inclusion au microscope électronique. Parallèlement, Angus (7) étudie les caractéristiques de *B. thuringiensis var Sotto* déjà cité. Il étudie principalement les propriétés de la toxine obtenue après dissolution alcaline des cristaux ; il confirme sa nature protéique et il en donne la composition globale en acides aminés. D'autre part, cet auteur a montré (6) que les cristaux de *B. sotto* peuvent être solubilisés par des broyats de l'intestin antérieur de *Bombyx mori* et que l'extrait ainsi obtenu détermine les mêmes symptômes d'intoxication que les cristaux, lorsqu'il est administré par voie orale.

Il convient de rappeler ici que les phénomènes d'intoxication précédemment décrits ne se produisent pas lorsque les cristaux ou les extraits qui en dérivent sont administrés aux larves par injection dans la cavité générale. Pour rendre compte de ces faits, Angus émet alors l'hypothèse que le cristal pourrait être une protoxine qui serait transformée au cours de son passage dans le tube digestif en un composé actif.

Ces différentes conclusions ont amené Martouret (113) (114), et nous-même (98) à rechercher comment pouvait se faire l'activation du cristal dans le tractus digestif des chenilles. En 1960, Martouret (114) met en évidence, par examen microscopique, la solubilisation totale des cristaux par le suc digestif de *Pieris brassicae* (la Piéride du chou) : il suppose que le principe toxique serait libéré au cours d'une lyse à caractère enzymatique.

Nous avons confirmé cette hypothèse (98), en réalisant *in vitro*, la dissolution de suspensions de cristaux de *B. thuringiensis* par le chyle contenu dans l'intestin antérieur de *Pieris brassicae*. Le lysat ainsi obtenu est directement toxique par injection dans la cavité générale. Il semble donc que nous ayons de cette manière libéré le motif toxique, autrement dit activé le cristal protoxine, en toxine vraie au cours d'une hydrolyse enzymatique, hydrolyse que nous avons attribuée à des enzymes protéolytiques dont la présence dans le chyle avait été démontrée (113).

Tel fut le point de départ d'un travail qui devait nous amener à étudier l'hydrolyse enzymatique du cristal de *B. thuringiensis* et à choisir comme système enzymatique les protéases du chyle de *Pieris brassicae*.

Le problème étant ainsi posé, nous aimerions ouvrir une parenthèse et donner quelques précisions sur la notion de toxine.

II. — LE CRISTAL DE B. THURINGIENSIS ET LA NOTION DE TOXINE

Tel que nous l'avons défini, le cristal se présente comme une inclusion protéique formée au cours de la sporulation d'une bactérie et libérée dans le milieu après la lyse des bacilles. Cette inclusion présente un caractère pathogène pour les larves de certains lépidoptères (*Bombyx, Pieris,* etc.). Pouvons-nous d'emblée lui

attribuer le qualificatif de toxine ? L'apparition de symptômes toxiques, qui est une notion qualitative, ne suffit pas à définir une toxine. Une substance peut être considérée comme toxique lorsqu'elle est administrée à dose très faible. Miranda (119), dans une étude sur les toxines de scorpions, précise que l'on doit indiquer le rapport entre le poids de la substance provoquant les effets toxiques et le poids de l'animal d'expérience. Il est admis que l'on peut considérer comme hautement toxiques les substances provoquant les symptômes considérés, à la dose du millionième, soit mg/kg ou µg/g d'animal. Ces conditions semblent réunies par le cristal de *B. thuringiensis* puisque les doses toxiques sont inférieures ou égales au µg/g de larve. Nous verrons que les lysats enzymatiques par le chyle de *Pieris* sont actifs à des doses très inférieures au µg.

Il est donc permis de considérer les dérivés du cristal comme des substances hautement toxiques qui, de plus, répondent aux critères connus des toxines microbiennes. Ces toxines produites par les bactéries sont en général des protéines et elles agissent à des doses très faibles.

D'autre part, nous savons que les toxines bactériennes sont en général classées en exotoxines et endotoxines, les exotoxines étant sécrétées ou libérées dans le milieu de culture alors que les endotoxines restent dans les bactéries et doivent faire l'objet d'une extraction. Or, le cristal est libéré dans le milieu seulement après rupture des bactéries. Il serait donc logique de le considérer comme une endotoxine.

Enfin, les manifestations de la toxicité provoquées par le cristal ou ses dérivés, à savoir : paralysie du tube digestif, survenant très rapidement après l'ingestion, laissent penser qu'il s'agit d'une neurotoxine. Angus (5), puis Martouret (114) supposent que seule une toxine agissant sur les centres nerveux peut déclencher cet ensemble de symptômes, bien que le mécanisme de l'intoxication ne soit pas encore élucidé.

Le cristal de *B. thuringiensis* pouvant ainsi être considéré comme une toxine, il est nécessaire de définir les espèces de lépidoptères vis-à-vis desquelles il manifeste des propriétés toxiques. Précisons tout d'abord que la toxicité concerne les chenilles de lépidoptères au cours des stades larvaires précédant la dernière mue. Les manifestations de l'intoxication sont variables d'une espèce à l'autre. Heimpel et Angus (78) ont proposé la classification des espèces sensibles à *B. thuringiensis* en trois catégories distinctes :

— La première catégorie comporte un petit nombre d'espèces dont les larves ont un pH intestinal élevé, de l'ordre de 10. A cette catégorie appartient le ver à soie. Les symptômes de l'intoxication sont les suivants : paralysie générale survenant dans les premières heures suivant l'ingestion, acidification du contenu intestinal, suivi de l'alcalinisation du pH du sang de l'insecte.

— Pour une deuxième catégorie à laquelle appartient la Pieride qui nous intéresse ici, l'ingestion des cristaux de *B. thuringiensis* est immédiatement suivie d'une paralysie buccale entraînant un arrêt de l'alimentation. On observe ensuite une paralysie plus ou moins totale du tube digestif, suivie de manifestations asthéniques entraînant la mort.

— Enfin, chez une troisième catégorie de chenilles à laquelle appartient *Ephestia kuniella* (la mite de la farine) l'intoxication n'est pas provoquée par l'ingestion des cristaux de *B. thuringiensis*, mais nécessite l'association du complexe spores - cristaux. La réaction de l'individu est ici plus complexe. L'étude de la toxémie chronique due à l'ingestion du complexe spores - cristaux a été spécialement étudiée par Yamvrias (183). Pour cette catégorie d'insectes dont le pH intestinal est inférieur à 8,5, il ne semble pas que les cristaux subissent une dissolution par les enzymes digestifs puisqu'ils sont inactifs lorsqu'ils sont ingérés seuls. Par contre, ces chenilles sont sensibles aux produits de dissolution des cristaux par le chyle de Piéride. Yamvrias (183) a montré la toxicité de ces préparations après leur administration par injection.

Autrement dit, les manifestations de la toxicité, différentes selon les espèces, semblent liées à la possibilité de réaliser l'hydrolyse enzymatique des cristaux. Des espèces non sensibles à la toxine figurée seule, peuvent être intoxiquées par des substances qui en dérivent.

En conclusion: ce cristal protéique, toxique pour différentes espèces de chenilles et agissant très probablement comme neurotoxine, est en réalité une protoxine. Il se présente comme un précurseur inactif transformé en toxine vraie par les protéases du tractus digestif de l'animal intoxiqué.

III. — PLAN DU TRAVAIL

Le lien entre le cristal de *B. thuringiensis* et les protéases de *Pieris brassicae* étant défini par l'ensemble de ces considérations, revenons à l'objet même de ce travail et voyons comment nous avons dû l'aborder.

Le problème qui nous intéresse se ramène en fait à une étude de protéolyse à laquelle s'ajoute le cas particulier de l'activation qui rend le substrat en quelque sorte complémentaire des enzymes d'hydrolyse.

Ce système complémentaire : protéases, cristal, est en réalité très complexe, de par la nature même du substrat qui est une molécule organisée de haut poids moléculaire et de par la composition du matériel enzymatique.

L'étude de l'hydrolyse enzymatique ne pouvait être entreprise avant d'avoir bien défini chacun des composants du système. C'est

pourquoi nous avons dû envisager dans l'ordre suivant les différents aspects de ce travail :

1° Etude des protéases du chyle de *Pieris*. A partir du chyle brut, formé de nombreux constituants, nous avons cherché à extraire les enzymes responsables de l'hydrolyse du cristal. Nous avons pu isoler deux protéases, dont il a fallu définir les principales propriétés. L'utilisation de ces enzymes ne pouvait se faire sans en connaître la spécificité.

2° Préparation et composition du substrat. Il s'agissait tout d'abord d'isoler ces cristaux à partir du mélange « spores - cristaux » qui est recueilli en fin de culture. Ce problème étant résolu il convenait ensuite de réunir quelques notions élémentaires sur la constitution du substrat (composition quantitative en acides aminés) et sur sa structure. Nous avons cherché à dissocier les chaînes protéiques qui constituent le cristal en étudiant l'action des agents réducteurs de liaisons disulfure. De cette manière nous avons pu recueillir quelques données intéressantes sur la composition de ce substrat.

3° Etude de l'hydrolyse enzymatique par les protéases de *Pieris*. Ayant caractérisé d'une part le système enzymatique, d'autre part le substrat, nous avions les éléments nécessaires pour étudier la réaction de protéolyse. Nous avons d'abord analysé la composition globale des lysats et suivi la libération du motif toxique par des dosages d'activité sur divers constituants de ce lysat.

Il nous a semblé intéressant de chercher à isoler parmi les substances libérées au cours de l'hydrolyse le plus petit peptide manifestant encore une activité toxique, ce qui faciliterait ultérieurement la recherche du motif toxique.

4° Enfin, nous nous sommes demandé si ce système enzymatique était le seul capable d'hydrolyser le cristal de *B. thuringiensis*. Cela nous a amenée à étudier l'action des enzymes protéolytiques les plus répandus, de spécificité connue, sur les préparations de cristaux. Trypsine, chymotrypsine, pepsine et papaïne ont été utilisées. Ces différents enzymes étant en général très peu actifs (pepsine excepté) sur les protéines natives, il était permis de supposer qu'ils seraient à plus forte raison sans action sur une protéine figurée, autrement dit, sur le substrat étudié ici. Cette étude nous a amenée à considérer comme privilégiées les conditions d'action des protéases du chyle sur l'inclusion protéique de *B. thuringiensis*.

En résumé, dans une première partie nous envisagerons tout ce qui concerne les protéases de *Pieris*, dans une deuxième partie nous étudierons le cristal, son hydrolyse par les protéases de *Pieris* et l'action comparée de différents enzymes protéolytiques.

CHAPITRE I

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Dans ce premier chapitre, nous envisagerons successivement l'ensemble des techniques qui nous ont permis de suivre l'activité enzymatique des protéases de *Pieris* et de caractériser les enzymes : dosages d'activité, techniques d'électrophorèse, techniques immunochimiques. Nous donnerons aussi la technique du dosage biologique utilisé pour la détermination de l'activité toxique des lysats enzymatiques.

Avant l'exposé de ces techniques, nous envisagerons d'abord la manière dont nous avons obtenu les constituants fondamentaux du système :

— le matériel enzymatique : chyle de *Pieris ;*

— le substrat principal : les cristaux de *B. thuringiensis.*

A. — MATÉRIEL

1. — Le chyle de Pieris brassicae

Le chyle, que nous appellerons aussi régurgitat, est en réalité le contenu de l'intestin antérieur, des chenilles. Il est obtenu par régurgitation spontanée des Piérides préalablement soumises à un jeûne de 24 heures. L'émission de une à deux gouttes de chyle est en effet un mécanisme réflexe déclenché par la préhension de l'animal.

Plusieurs milliers de chenilles au cinquième âge larvaire sont nécessaires pour obtenir 100 ml de régurgitat. La régurgitation est provoquée trois fois sur chaque larve, à 24 heures d'intervalle.

La récolte du chyle a été effectuée à la Station de Lutte biologique et de Biocénotique de la Minière dont la collaboration nous fut indispensable.

Le chyle ainsi recueilli est centrifugé à 4° et conservé congelé à — 15°. Dans ces conditions la préparation peut être conservée plusieurs mois sans altération de l'activité enzymatique.

2. — **Les cristaux de** B. thuringiensis

a) **Cultures de** B. thuringiensis

La souche utilisée est *B. thuringiensis* var Berliner (*) de la collection de l'Institut Pasteur. Elle est conservée en tubes scellés.

Les cultures sont réalisées en milieu liquide peptoné et glucosé, décrit par Beguin et Martouret (15), dans des cuves de 10 litres, avec arération continue, à 30°.

Lorsque la lyse des bactéries est totale, soit environ 48 heures après le début de l'incubation, les cultures sont centrifugées à grande vitesse (centrifugeuse Sharples : 30 000 tours par minute).

L'examen microscopique montre que, à ce stade, les cultures contiennent des spores et cristaux libres (en principe produits en quantité égale) des débris cellulaires et une faible proportion de bactéries non sporulées. L'élimination des débris et des bactéries asporogènes est obtenue par lavages, puis incubation dans une solution de chlorure de sodium molaire, qui provoque la lyse des bactéries restantes. Cette incubation est suivie de trois lavages à l'eau distillée. Le mélange « spores - cristaux » ainsi recueilli (20 à 30 g de culot humide) est centrifugé, puis remis en suspension au mixer dans 200 ml d'eau distillée. Cette suspension est conservée pendant une semaine à la chambre froide (+ 2°).

b) **Séparation des cristaux**

La préparation à ce stade doit être débarrassée des spores. Les premiers auteurs qui ont obtenu des préparations pures de cristaux (Angus et Hannay) utilisaient une technique assez longue qui consistait à provoquer la germination des spores et à effectuer, après autolyse spontanée, une série de centrifugations différentielles. De cette manière on ne pouvait préparer que de très faibles quantités de cristaux.

Nous avons cherché à mettre au point une technique plus rapide, et pour ce faire, nous nous sommes inspirée d'une autre méthode décrite par Angus (8) qui consistait à émulsionner la préparation dans un solvant : le fluorocarbone (trifluoro-trichoroéthane). Nous avons utilisé un solvant lourd (d = 2,9), le tétrabromoéthane qui est en général utilisé pour la séparation de minerais de densités différentes. La technique d'extraction est la suivante : la préparation « spores - cristaux » est mise en suspension dans l'eau au moyen d'un mixer, à raison de 2 grammes de matière humide pour 900 ml ; on ajoute à cette suspension 100 ml de tétrabromoéthane, soit environ le dixième du volume de la suspension. On réalise une émulsion en provoquant une agitation violente au moyen d'une turbine, pendant une durée variant de 30 secondes à une minute. Après cessation de l'agitation, l'émulsion se sépare

---

(*) Souche N° 1, selon classification de Barjac - Bonnefoi (13), stock N° 5, 125.

immédiatement en deux couches : le solvant lourd entraîne préférentiellement dans la phase inférieure les spores qui sont hydrophobes, les cristaux restent dans la phase supérieure. La phase aqueuse est de nouveau émulsionnée dans le solvant pendant 30 secondes, jusqu'à élimination totale des spores. La séparation est suivie au microscope et la durée de l'extraction est déterminée d'après cet examen. Les cristaux sont alors centrifugés puis remis en suspension dans l'eau physiologique ; on fait ensuite trois lavages à l'eau distillée. Nous obtenons de cette manière des préparations de cristaux dont la teneur en spores ne dépasse pas 1 p. 100.

Au cours de l'émulsion dans le solvant, il est nécessaire de surveiller attentivement la durée de l'agitation, un traitement prolongé par le solvant avec une agitation trop violente risque de provoquer des pertes importantes de cristaux qui seraient alors broyés.

Nous obtenons en général une quantité de cristaux de l'ordre de 1 gramme pour une culture de 10 litres. La toxicité des cristaux, déterminée après administration orale n'est nullement altérée par cette technique de séparation.

3. — **Réactifs et produits**

Enzymes

— Trypsine 2X cristallisée, lot N° 8 074.
— Chymotrypsine 2X cristallisée : lot N° 9003.
— Carboxypeptidase cristallisée : lot ε 109.
(Nutritional Biochemical Corporation).
— Pepsine cristallisée : lot c 2253.
— Papaïne cristallisée : lot c 2973.
(Mann Research Laboratories).

Substrats

— Albumine bovine, fraction V de COHN
(Réactifs Gentilly).
— Insuline bovine (pancréas) cristallisée, lot N° 35 754.
(California Corporation for Biochemical Research).
— Glucagon aimablement fourni par la Société Eli Lilly.
— Substrats synthétiques : CBZ-Phenylalanyl-Phenylalanine ; CBZ-Phenylalanyl-Leucine (Yeda) ; CBZ-Tryptophyl-Tyrosine ; CBZ-Leucyl-Phenylalanine ; CBZ-Alanyl-Leucine ; di-CBZ-Lysine amide (Cyclo Chemical Corporation) ; Benzoyl-Arginine amide ; Leucyl-Leucine ; Glycyl-L-Tyrosine ; Glycyl-L-Proline ; Alanyl-Glycyl-Glycine ; Acetyl Tyrosine Ethyl Ester (Nutritional Biochemical Corporation) ; CBZ-Glycyl Phenylalanine ; CBZ-Leucyl-Glycine ; Acetyl-Tyrosine amide ; Phenylalanyl amide (Sigma Chemical Co.) ; CBZ-Glutamyl-Tyrosine (Mann).

Sephadex et résines

— Sephadex G-25, G-50, G-75, medium.
— DEAE Sephadex A-50, lot : T 1 602, capacité : 3,5 mEq/g.
— DEAE Sephadex A-25, lot : T 8 870.
(Pharmacia UPPSALA).
— DEAE cellulose, lot : 1 337, capacité : 0,83.
— CM cellulose, lot : 1 190, capacité : 0,78.
(Carl Schleicher et Schull Co).
— Amidon hydrolysé pour gel d'électrophorèse.
(Connaught Medical Research Laboratories, Toronto).

Réactifs

— Ninhydrine (Touzart et Matignon) recristallisée au laboratoire.
— 2,4-Dinitrofluorobenzene (Serlabo).
— Parachloromercuribenzoate (California Corporation for Biochemical Research).
— Acide thioglycolique pur (Serlabo).
— Diisopropylfluorophosphate.
— Iodoacétamide (Light et Co.).
— Inhibiteur de trypsine, lot : 5 920 (Nutritional Biochemical Co.).

B. — TECHNIQUES

1. — Détermination de l'activité enzymatique des préparations de Pieris brassicae

Pour caractériser l'activité enzymatique du chyle et pour la suivre au cours de la purification des enzymes, il était tout d'abord nécessaire de mettre au point des dosages d'activité.

Puisque nous avions attribué la lyse des cristaux par le chyle de *Pieris* à la présence de protéases, nous avons pensé qu'il convenait de suivre parallèlement : l'activité protéolytique sur un substrat autre que le cristal et l'activité de lyse sur des suspensions de cristaux. L'évolution parallèle de ces deux types d'activité permettrait de considérer la lyse des cristaux comme une protéolyse.

Nous avons donc mis au point deux dosages :
— un dosage classique de protéases,
— un dosage de lyse des cristaux de *B. thuringiensis*.

a) Dosage de protéases

Les méthodes classiques de dosage de l'activité protéolytique utilisent le plus souvent comme substrat soit l'hémoglobine [technique de Anson (9)], soit la caséine employée par Kunitz (94) pour doser la trypsine, soit même la sérum-albumine (97). Elles ont pour

principe de suivre la dégradation des protéines due à l'action de l'enzyme en dosant les peptides restant dans les surnageants de précipitation par l'acide trichloracétique 5 p. 100.

Dans le cas présent, nous avons utilisé comme substrat l'albumine bovine qui est préalablement dénaturée par chauffage à 100° pendant 20 minutes, à la concentration de 1 p. 100 en tampon bicarbonate 0,05 M de pH 9,5. Nous avons choisi ce pH 9,5 qui est celui du chyle *in vivo* et par conséquent celui de l'hydrolyse enzymatique *in vivo*. Nous verrons dans le chapitre suivant que le pH optimum d'action des protéases du chyle se situe en milieu alcalin.

Après dénaturation la solution d'albumine bovine 1 p. 100 est incubée avec la préparation enzymatique à différentes concentrations (comprises entre 5 et 20 µg/ml) à 35° en tampon bicarbonate 0,05 M, pH 9,5. La durée de l'incubation est de 40 minutes.

L'apparition des peptides dans les surnageants de précipitation par le TCA 5 p. 100 est suivie par lecture de l'absorption à 280 mµ, au spectrophotomètre Beckman, dans des cuves de 1 cm de trajet optique.

L'unité enzymatique a été définie comme la quantité d'enzyme provoquant une augmentation de la densité optique de 0,100 pour un trajet optique de 1 cm, dans les limites 0,100 à 0,500.

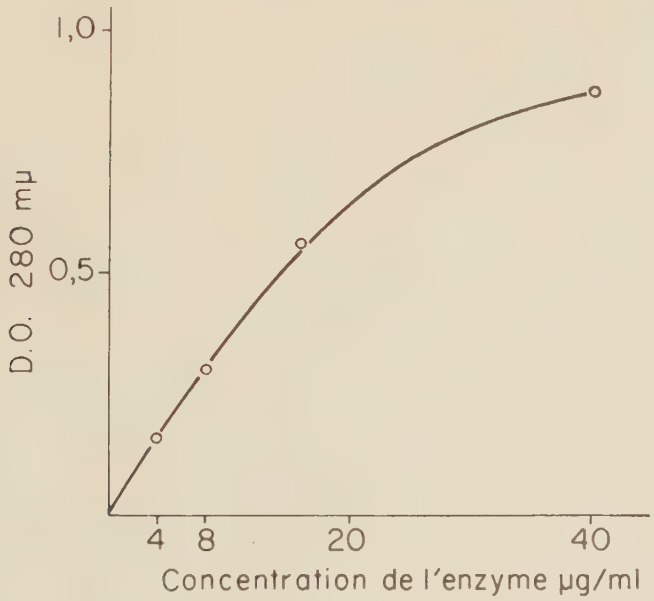


Figure 2.

Dosage de l'activité protéolytique sur l'albumine bovine dénaturée. Concentration de la protéine substrat : 1 p. 100.

Nous voyons (figure 2) que l'activité protéolytique est une fraction linéaire de la concentration en enzyme, dans les limites de densité optique 0,100 à 0,500. Au-delà de cette densité optique, l'absorption à 280 mμ n'est plus proportionnelle à la quantité d'enzyme ajoutée.

Dans la pratique, il suffit de deux dosages par préparation enzymatique pour déterminer l'activité.

b) **Dosage de lyse des cristaux de** Bacillus thuringiensis

Pour la mise au point de ce dosage, nous nous sommes inspirée d'une technique utilisée par E. Work (182) pour mesurer l'action lytique des spores d'un *Bacillus* sur différentes espèces bactériennes.

La lyse du substrat due à une action enzymatique est suivie en estimant la chute de densité optique des préparations par lecture directe dans des tubes carrés de 1 cm de trajet optique utilisés pour l'incubation.

Nous réalisons le dosage de la manière suivante : à une série de tubes contenant l'enzyme à différentes concentrations en tampon bicarbonate 0,05 M, de pH 9,5, dans un volume de 0,75 ml, on ajoute au temps 0 de l'expérience un égal volume d'une suspension de cristaux de *B. thuringiensis* à la concentration de 0,3 mg/ml. La concentration finale des cristaux se trouve être de 150 μg/ml. L'incubation est réalisée à 30° avec agitation. La lecture directe des densités optiques sur les tubes d'incubation est effectuée au photomètre Meunier avec un filtre orange.

L'examen des courbes de lyse en fonction de la concentration en enzyme, à divers temps d'incubation (figure 3 a) nous montre l'extrême sensibilité de ce dosage qui permet d'estimer des quantités d'enzymes comprises entre 1 et 4 μg/ml. Nous voyons que les chutes d'opacité sont proportionnelles aux quantités d'enzyme ajoutées, lorsque la lyse ne dépasse pas 40 p. 100. Au-delà de cette valeur, la courbe s'infléchit. Les mesures d'activité doivent être estimées dans la partie linéaire de la courbe.

Si nous représentons l'évolution de l'activité lytique en fonction du temps, nous remarquons (figure 3 b) que, au-delà de 40 minutes d'incubation, la réaction n'est plus linéaire pour les concentrations les plus élevées d'enzyme. Pour cette raison, nous avons fixé la durée du dosage à 40 minutes, ce qui permet de doser des quantités très faibles d'enzyme de 0,5 à 2 μg/ml, selon la pureté des préparations. Nous avons défini l'unité enzymatique comme la quantité d'enzyme capable de provoquer une chute de la densité optique de 20 p. 100 en 40 minutes dans les limites de 0 à 40 p. 100. Ces deux dosages vont nous permettre de suivre l'activité enzymatique au cours de la purification et de déterminer l'activité spécifique des diverses préparations. L'activité spécifique est définie comme étant le nombre d'unités enzymatiques par mg de protéines.

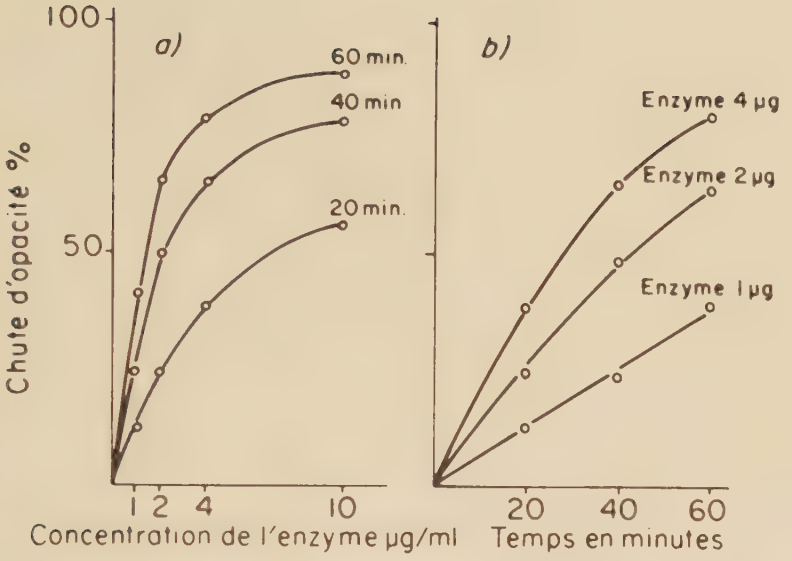


Figure 3

Dosage de l'activité de lyse sur une suspension de cristaux de B. thuringiensis.

a) *Lyse en fonction de la concentration de l'enzyme.*

b) *Lyse en fonction du temps.*

c) Dosage des protéines

Pour la détermination des protéines, nous avons utilisé la technique colorimétrique de Lowry et coll. (107) de préférence à la mesure de l'absorption à 280 mµ. Cette dernière méthode n'est significative que dans les cas où les préparations de protéines ne sont pas contaminées par d'autres substances absorbant à 280 mµ et 260 mµ (acides nucléiques, etc.) elle ne peut convenir en début de purification et d'autre part, l'utilisation du tampon véronal qui absorbe fortement à 260 mµ est un obstacle majeur.

La technique de Lowry est sensible et beaucoup plus rapide que la détermination de l'azote aminé par microkjeldall. Elle est réalisée de la manière suivante : à 0,5 ml de solution protéique, on ajoute 5 ml de solution alcaline, après 15 minutes d'attente on ajoute 5 ml de réactif de Folin et Ciocalteu dilué au tiers (51). Après 30 minutes, la densité optique des solutions est mesurée au spectrophotomètre Coleman Junior à 660 mµ. La détermination des quantités de protéines est obtenue par comparaison avec une gamme d'albumine bovine, établie pour chaque série de dosages.

d) **Dosage de l'activité amidasique ou peptidasique**

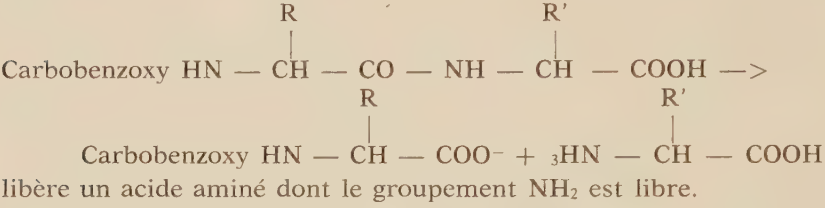
Au cours de l'étude de la spécificité nous serons amenée à étudier la rupture des liaisons peptidiques sur un certain nombre de substrats synthétiques qui sont des amides des dérivés alkylés des acides aminés ou des dipeptides substitués.

La rupture de la liaison amide :

$$RCONH_2 + H_2O \rightarrow RCOO^- + NH^+_3$$

libère de l'ammoniaque.

Lorsque le substrat est un dipeptide on utilise de préférence des dipeptides dont le NH_2 terminal est substitué par le radical carbobenzoxy. Dans ces conditions la rupture de la liaison peptidique :



libère un acide aminé dont le groupement NH_2 est libre.

La détermination de l'activité amidasique ou peptidasique revient donc à estimer l'ammoniaque ou les acides aminés libérés (38). C'est pourquoi la méthode colorimétrique de dosage par la ninhydrine selon la technique de Moore et Stein (125) est la plus utilisée. Le substrat à la concentration finale $2{,}5.10^{-3}$ M est incubé en présence de l'enzyme à différentes concentrations en milieu tamponné au pH désiré (9,5 ou 10,5 selon les expériences) à 35° pendant 30 minutes ou 1 heure selon les substrats. Le volume d'incubation est de 1 ml. Le dosage à la ninhydrine est effectué sur des prises d'essai du milieu réactionnel complétées à 1 ml avec une solution de tampon citrate 0,1 M, pH 5,0. On ajoute 1 ml du réactif à la ninhydrine (20 g de ninhydrine + 3 g d'hydrindantine dans 750 ml de methylcellosolve + 250 ml de tampon acétate pH 5,5), puis on chauffe au bain-marie bouillant pendant 20 minutes. Après refroidissement, on ajoute au dosage 5 ml de diluant : ethanol 50 p. 100. La lecture est effectuée à 570 mμ au spectrophotomètre Coleman junior.

L'estimation de l'ammoniaque ou des groupements aminés libérés est obtenue en lisant l'absorption des extraits comparativement à celle de témoins traités de la même manière et contenant seulement le substrat.

e) **Activité estérasique**

Les enzymes protéolytiques les plus connus possèdent en général une activité estérasique qui est la propriété d'hydrolyser les esters des acides aminés selon la réaction générale d'hydrolyse des esters :

$$RCOOR' + H_2O \rightarrow R'OH + RCOO^- + H^+$$

La libération des ions R — COO^- permet une estimation quantitative de l'activité estérasique (méthode potentiométrique de Schwert et coll. (154 (155). La mesure des quantités de NaOH ajoutées par unité de temps pour neutraliser les groupes carboxyliques apparus est une mesure quantitative de la réaction. L'activité estérasique de la trypsine (155) et de la papaïne a été déterminée de cette manière (9).

Nous utilisons cette technique dans le cas des enzymes de *Pieris*, de la manière suivante : le substrat, à la concentration finale de $2{,}5.10^{-3}$ M dans un volume de 25 ml, en tampon bicarbonate 0,02 M, de pH 9,5, est maintenu à 27° dans une cellule thermostatée dans laquelle on plonge l'électrode de verre d'un pH mètre. Après l'addition de 0,5 ml de la solution enzymatique, on suit les variations du pH qui est maintenu à sa valeur initiale par addition de NaOH 0,02 N. Une agitation électromagnétique permet l'homogénéisation constante du milieu réactionnel.

Le graphique portant en abscisse le temps exprimé en minute et en ordonnée les quantités de NaOH ajoutées permet de déterminer le nombre de groupements $RCOO^-$ libérés par unité de temps qui caractérise le nombre de molécules de substrat hydrolysées.

2. — Techniques chromatographiques

Pour effectuer la purification des enzymes et pour isoler les divers constituants dans les hydrolysats enzymatiques, nous avons utilisé des techniques de chromatographie sur colonne utilisant :

a) Des gels de dextrane

La chromatographie sur gel de dextrane, décrite par Porath (136) puis par Gelotte (58) est maintenant suffisamment répandue pour qu'il ne soit pas nécessaire d'en décrire les principes.

La filtration moléculaire qui est réalisée au cours du passage des substances entre les mailles du gel permet une séparation préliminaire satisfaisante des constituants d'un mélange complexe, en groupes de poids moléculaires différents. Cette technique a été utilisée par Porath (137) (138) pour fractionner des mélanges contenant protéines, peptides et acides aminés, et appliquée à la préparation de divers enzymes protéolytiques (59) (73).

Au cours de la chromatographie sur colonne, les substances de haut poids moléculaire sortent immédiatement après le volume de rétention de la colonne, viennent ensuite les substances qui sont de la dimension de la maille du gel, enfin les molécules plus petites : peptides et acides aminés sortent en fin d'élution.

Nous avons utilisé au cours de ce travail les Sephadex G-75, G-50 et G-25.

b) Des résines échangeuses d'ions

Les échangeurs d'ions le plus couramment utilisés pour la

chromatographie des enzymes sont les dérivés substitués de la cellulose (133), diéthylamino-éthyl-cellulose (DEAE) et carboxyméthyl-cellulose (CM) qui permettent la séparation d'un grand nombre de constituants dans les milieux biologiques : sérum (162), venin de crotales (26), etc. Ces échangeurs d'ions ont une capacité d'adsorption plus grande que les résines type Dowex ou Amberlite et conviennent mieux pour la chromatographie des protéines.

La carboxyméthylcellulose est parmi les échangeurs de cations (133) l'un des plus utilisés pour la purification des enzymes ; elle a permis la préparation du lysozyme (143), de la glutamique aspartique transaminase (46), de la phosphodiestérase (142), etc.

D'autre part, la fixation de groupements ioniques sur gel de dextrane a donné naissance à une série de dérivés du Sephadex, présentant une capacité d'adsorption élevée : DEAE Sephadex : échangeur d'anions, CM Sephadex : échangeur de cations. Ces résines existent à différents degrés de polymérisation et permettent d'associer une filtration moléculaire au fractionnement selon l'ionisation — Porath (139) — la chromatographie sur DEAE Sephadex, par exemple, a été utilisée pour la purification des enzymes et notamment pour le fractionnement de protéases (108) (109).

Nous avons employé la DEAE cellulose, le DEAE Sephadex A-50 medium et la CM-cellulose pour la purification des protéases de *Pieris*.

Le DEAE Sephadex A-25 medium a permis le fractionnement des peptides dans les lysats enzymatiques de cristaux.

3. — Techniques d'ultracentrifugation

Les préparations enzymatiques de *Pieris* au cours de la purification et les produits résultant de la solubilisation des cristaux de *B. thuringiensis* ont été soumis à l'ultracentrifugation analytique, dans une centrifugeuse Spinco dont la vitesse maximum de rotation atteint 59 870 tours par minute. Les expériences ont été réalisées à 20°.

La détermination du poids moléculaire d'une protéine dont on connaît la constante de sédimentation peut être calculée en utilisant la formule de Svedberg (153) (169) qui fait appel à la relation : $M = \frac{RT\ s}{D\ (1 - V\rho)}$

où

M = poids moléculaire,
s = constante de sédimentation,
R = constante des gaz parfaits,
T = température absolue,
V = volume spécifique partiel,
ρ = densité du milieu,
D = constante de diffusion.

Sachant que la valeur moyenne de la constante de diffusion des protéines généralement admise est $D = 7.10^{-7}$ cm²/s et que $V = 0,7$ cm³/g, l'équation devient : $M = 12\,900\ s$ à 20°. D'où connaissant **s**, nous en tirons une valeur très approchée du poids moléculaire de la protéine considérée.

4. — Techniques d'électrophorèse

Les possibilités offertes par les techniques d'électrophorèse sur différents supports : gel d'amidon, gélose, permettent de suivre le fractionnement des enzymes au cours de la purification et constituent aussi l'un des critères de pureté.

a) Electrophorèse sur gel d'amidon

Les premières réalisations utilisant le gel d'amidon comme support d'électrophorèse ont été décrites par Smithies (159) (161) et font l'objet de nombreuses applications. La séparation électrophorétique sur ce support met en jeu, d'une part la charge des protéines, mais aussi la structure du gel qui réalise une filtration moléculaire et retarde les molécules les plus volumineuses. De cette manière, les possibilités de séparation et de résolution des protéines sont accrues. La technique est suffisamment connue à l'heure actuelle pour qu'il ne soit pas nécessaire de la décrire dans le détail. Nous signalerons seulement les modalités d'utilisation dans le cas particulier qui nous intéresse ici.

Préparation du gel

Nous avons utilisé un gel d'amidon contenant de l'urée à la concentration 6 M et préparé selon la technique de Poulik (141). La présence de l'urée en facilitant la migration des protéines permet d'obtenir des séparations plus nettes entre les différents constituants. Le gel utilisé contient 17 g d'amidon hydrolysé en poudre et 36 g d'urée pour 100 ml de tampon borate 0,3 M, pH 8,4. Ce mélange est agité vigoureusement et donne une solution visqueuse qui est chauffée dans la flamme puis débullée au moyen d'une trompe à vide. Le gel liquéfié puis débullé est alors coulé dans des supports en matière plastique décrits par Fine et Moretti (49). Ces supports sont constitués par deux plaques de matière plastique de 3 mm d'épaisseur, l'une mobile, l'autre fixée sur le fond, et par un couvercle percé de deux orifices aux extrémités. La connection avec les bacs contenant le tampon est assurée au moyen de ponts de papier. Après le coulage du gel, on dispose à l'endroit de l'origine un emporte-pièce qui restera au cours de la prise du gel. Le réservoir ainsi constitué est destiné à recevoir l'échantillon. La prise du gel à l'urée est plus longue que celle du gel simple et nécessite un minimum de 10 heures d'attente.

Insertion de l'échantillon

La solution de protéines à analyser doit atteindre une concentration minimum de 5 mg/ml. L'échantillon doit être dialysé contre le tampon utilisé pour la préparation du gel, il est ensuite mélangé à une poudre d'amidon soluble de manière à obtenir une pâte imprégnée de la substance à analyser qui est déposée dans le réservoir. Cette technique d'insertion est utilisée lorsque l'électrophorèse est réalisée dans le sens horizontal. Les séparations sont parfois meilleures lorsque la migration est effectuée dans le sens vertical (161). Dans ce dernier cas, il ne se produit pas de phénomènes d'électrodécantation de l'échantillon, il est alors possible de déposer la solution de protéines, sans support d'amidon, dans des fentes très fines (épaisseur inférieure à 1 mm), et on recouvre le réservoir avec de la vaseline. On assure la connection avec les bacs qui contiennent du tampon borate 0,03 M, pH 8,9 (49). L'électrophorèse a lieu sous un courant de 5 volts/cm pendant 18 heures.

Révélation des protéines

Après migration, le gel est immergé dans une solution d'acide acétique 5 p. 100 pour la fixation des protéines. Il est alors sectionné transversalement en deux parties de 3 mm d'épaisseur et révélé dans une solution alcoolo-acétique d'amido-schwartz. Les séparations obtenues par cette technique sont supérieures à celles qui sont réalisées par électrophorèse sur gélose. Nous parlerons cependant de cette dernière méthode plus facilement utilisable pour des caractérisations spécifiques de protéines.

b) **Electrophorèse sur gélose**

La technique utilisée est celle qui est décrite par Grabar et coll. (64). Nous utilisons ici des plaques de verre de 18 cm de longueur recouvertes d'une couche de 3 mm de gélose à 1,5 p. 100 en tampon véronal 0,05 M de pH 8,6. On dépose 0,1 ml de la solution de protéines à la concentration de 0,3 à 0,5 p. 100 dans le réservoir. L'électrophorèse est réalisée sous un courant de 5 volts/cm pendant 3 heures. Nous prévoyons trois plaques pour l'étude de chaque préparation :

— l'une des plaques sera utilisée pour la révélation des protéines par l'amido-schwartz ;
— une autre plaque servira à la caractérisation de l'activité protéolytique ;
— la troisième plaque sera réservée pour la réaction immunochimique.

Caractérisation de l'activité protéolytique

La mise en évidence de l'activité protéolytique sur plaque de gélose, après électrophorèse, a été décrite par Uriel (178), puis utilisée par Uriel et coll. (177) pour l'étude d'un extrait de rate de lapin.

Cette technique est réalisée ici dans les conditions suivantes : les plaques de gélose sont immergées dans une solution de caséine 1 p. 100 en tampon véronal de pH 8,6 pendant 15 minutes à 37°. La plaque, ainsi recouverte d'une pellicule de caséine, est laissée à 37° pendant 2 heures en atmosphère humide. Après ce temps d'incubation, les plaques sont fixées dans une solution d'alcool à 50 p. 100 contenant 4 p. 100 d'acide acétique. Elles sont ensuite desséchées pendant 24 heures à l'étuve à 37°, puis révélées par l'amido-schwartz. Après révélation, les protéases qui ont digéré la caséine, apparaissent comme une tache claire sur un fond sombre dû à la coloration du film de caséine par l'amido-schwartz. Cette technique est très sensible et nécessite de faibles quantités d'enzyme (50 à 100 μg).

Caractérisation de l'activité amidasique ou peptidasique

La caractérisation de chacune des protéases par leur action sur des substrats synthétiques a pu être effectuée sur les plaques de gélose, après découpage en fractions et élution ; les éluats sont alors incubés avec les différents substrats. Cette dernière technique a été utilisée au cours de l'étude de la spécificité.

c) **Electrophorèse sur papier : finger-printing et révélations spécifiques des différents acides aminés**

La composition des hydrolysats résultant de l'action des protéases de *Pieris* sur des peptides de structure connue : insuline et glucagon, a été examinée par électrochromatographie sur papier :

— Nous avons utilisé la technique de « finger-printing » d'après le principe de Ingram (83) (84) selon une adaptation de Bernard et Boulanger (22) : 1,5 mg de lysat est déposé sur une feuille de papier Whatman 3, dans la première dimension on réalise la chromatographie descendante dans le solvant butanol — acide acétique — eau (4 : 1 : 5) pendant 18 heures. Le chromatogramme est séché sous ventilation, puis on effectue dans la deuxième dimension une électrophorèse en tampon acétate de pyridine 1 p. 100 de pH 4,5 sous 1 000 volts pendant 2 h 30. Le chromatogramme est ensuite séché sous hotte pendant plusieurs heures, puis révélé dans une solution acétonique de ninhydrine à 0,2 p. 100. On laisse la coloration se développer sans chauffage pendant 24 heures.

— Révélations spécifiques de différents acides aminés : l'identification des peptides ou acides aminés libres sur les cartes résultant de l'électrochromatographie a été réalisée au moyen de réactions colorées spécifiques des acides aminés suivants : tyrosine, histidine, arginine, tryptophane, proline, méthionine ou cystine.

— Pour la tyrosine : réactif de Gerngross utilisant l'α-nitro-so-β-naphtol (88) (1).

— Histidine : réactif de Pauly utilisant la sulfanilamide (88) (25).

— Arginine : réactif de Sakaguchi (88) utilisant la 8-hydroxyquinoléine (85).

— Tryptophane : réactif d'Erlich (88) utilisant le paradimethylaminobenzoldehyde (170). La présence du tryptophane peut aussi être décelée par l'absorption des taches en lumière ultraviolette.

— Proline : réactif à l'isatine (88) (120).

— Méthionine ou cystine : réactif à l'iodoplatinate spécifique des acides aminés soufrés (88) (174).

Ces différentes réactions sont décrites dans la littérature.

5. — Identification des acides aminés N et C terminaux

a) L'identification des acides aminés N terminaux

L'identification des acides aminés N terminaux des produits résultant de la solubilisation des cristaux est effectuée par la technique au fluorodinitrobenzène de Sanger (149) (150).

La DNP-protéine est préparée en milieu bicarbonate, selon Fraenkel Conrat (52) (53) avec une solution de dinitrofluorobenzène à 5 p. 100 dans l'éthanol. L'hydrolyse acide est effectuée à 105 ° pendant 16 heures par HCl 6 N. L'hydrolysat est extrait par l'éther et l'identification des acides aminés terminaux est réalisée par chromatographie unidimensionnelle dans les systèmes de solvants :

— Alcool amylique tertiaire saturé de phtalate, pH 6,0 (24).

— Alcool isoamylique - phénol - eau (1 : 1 : 1) (23).

— Tampon phosphate 1,5 M, pH 6,0 (103).

— Toluéne - pyridine - monochlorhydrine du glycol - ammoniaque 0,8 N (5 : 1 : 3 : 3)

ou par chromatographie bidimensionnelle dans le système toluène - phosphate (23).

L'évalution quantitative de ces DNP-aminoacides a été réalisée selon la technique de Levy (102) : les taches correspondant aux différents groupes terminaux sont éluées par une solution de bicarbonate à 1 p. 100, à 50°, pendant 20 minutes ; les densités optiques des éluats sont lues à 360 mμ et on calcule la valeur des rapports moléculaires en multipliant les densités optiques par les facteurs de Levy correspondant à chaque acide aminé.

b) Analyse des groupements C terminaux

L'identifaction de l'acide aminé C-terminal des peptides résultant de l'hydrolyse enzymatique des cristaux est réalisée au moyen de la carboxypeptidase (52), selon la technique utilisée par Bricas et coll. (29).

Le peptide à analyser (1 mg) en solution dans 1 ml de tampon véronal 0,03 M pH 7,5 contenant du ClNa 0,1 M, est hydrolysé par 50 μg de carboxypeptidase pure ; l'incubation est réalisée à 37° pendant 20 heures. Des prélèvements de 0,2 ml sont effectués

après 30 minutes, 1 heure, 2 heures et 20 heures d'hydrolyse. L'identification des acides aminés libérés est obtenue par chromatographie unidimensionnelle dans le solvant butanol - acide acétique - eau (4 : 1 : 5).

6. — Dosage des oses totaux par la méthode à l'orcinol

Cette technique basée sur la réaction de l'orcinol avec les oses en milieu sulfurique (145) (86) permet de doser les sucres libres ou engagés dans des nucléotides ou des complexes glucoprotéiques. Elle est réalisée de la manière suivante : à 1 ml de la solution à analyser on ajoute 2 ml d'une solution d'orcinol à 1,5 p. 100 dans l'acide sulfurique à 30 p. 100 et 15 ml d'une solution aqueuse de SO_4H_2 à 60 p. 100. On chauffe pendant 20 minutes à 80°, on refroidit et on laisse à l'obscurité pendant 45 minutes. On mesure alors l'absorption à 510 mμ. Les résultats sont exprimés par rapport à une gamme de sucres témoin contenant de 40 à 200 μg d'un mélange galactose + mannose. Cette technique, qui permet de doser des quantités de sucres supérieures à 20 μg, a été utilisée pour vérifier l'absence de sucres ou de dérivés des sucres dans les préparations de cristaux de *B. thuringiensis*.

7. — Techniques immunochimiques

Les protéines possèdent des propriétés antigéniques et l'étude des réactions antigène-anticorps entre un mélange de protéines et l'antisérum correspondant peut constituer l'un des moyens de dénombrer les différents constituants de ce mélange.

De ce fait, on peut suivre la purification des protéines et par conséquent la purification des enzymes par l'utilisation des techniques immunochimiques permettant le dénombrement des anticorps.

Nous avons tout d'abord préparé des immun-sérums contre le système enzymatique de *Pieris* puis étudié la formation des complexes antigène-anticorps en milieu gélifié par la technique d'Ouchterlony et l'immunoélectrophorèse.

a) Préparation des antisérums

Une préparation enzymatique au stade I de purification a été utilisée pour immuniser un lot de quatre lapins. Une première injection sous-cutanée de 10 mg de protéines par lapin a été réalisée selon la technique de Freund (55). Trois semaines après cette première injection, nous effectuons 3 injections de rappel (5 mg de protéines par lapin) par injection sous-cutanée. Ces injections ont été faites à 8 jours d'intervalle ; elles sont suivies de deux rappels intraveineux, distant de trois jours, dans le but d'augmenter le taux des anticorps (42).

On peut suivre la formation des anticorps en cours d'immunisation au moyen des tests en anneaux, réaction en milieu liquide dans un tube de très faible diamètre (2 à 3 mm), entre le sérum de l'animal immunisé et une solution d'antigène. La présence des anticorps dans le sérum se manifeste par la formation d'un anneau opalescent à l'interface des deux liquides. La saignée des animaux est effectuée lorsque ces tests sont positifs. Les sérums sont recueillis stérilement et répartis en ampoules stériles en présence de merthiolate (1 pour 5 000) antiseptique qui doit empêcher une éventuelle contamination par des bactéries.

b) **Caractérisation des anticorps**

1) *Technique d'Ouchterlony*

Une technique simple de précipitation en milieu gélifié a été décrite par Ouchterlony (131) et modifiée par Mansi (111). Elle consiste à pratiquer des réservoirs dans une boîte de gélose à 1,5 p. 100. Dans le réservoir central on dépose l'antisérum, autour de ce réservoir sont disposés d'autres orifices contenant les solutions d'antigène.

A chaque antigène correspond en principe un anticorps dont la rencontre avec l'antigène, au cours de leur migration respective dans la gélose, donne lieu à la formation d'une ligne de précipitation. Le nombre de lignes de précipitation correspond au nombre minimum d'antigènes présents dans le mélange. Cette technique a été réalisée à divers stades de la purification des enzymes.

2) *Immunoélectrophorèse en gélose*

Après migration électrophorétique dans la gélose, selon la technique de Grabar (64) décrite ci-dessus, on creuse une rigole dans le sens longitudinal de la plaque et on dispose l'antisérum dans cette rigole.

L'apparition d'une ligne de précipitation au niveau de chaque antigène permet de caractériser chacun des antigènes après leur migration dans la gélose.

8. — Dosages de toxicité sur les hydrolysats enzymatiques des cristaux (*)

L'estimation de la toxicité des hydrolysats enzymatiques des cristaux de *B. thuringiensis*, par les protéases du chyle de *Pieris*, vis à vis des larves de ce lépidoptère est réalisée au moyen d'un dosage biologique.

Nous avons déjà exposé les symptômes de l'intoxication décrits

(*) Ces dosages ont été effectués à la Station de Lutte biologique et de biocénotique de La Minière.

par Martouret (114). Rappelons les caractéristiques essentielles de ces symptômes :

— paralysie buccale entraînant un arrêt de l'alimentation dans les premières heures suivant l'ingestion.

— troubles digestifs suivis de paralysie générale entraînant la mort dans les 48 heures suivant l'intoxication.

Réduction de consommation alimentaire et mortalité ont été retenus comme critères pour apprécier l'efficacité des préparations (98).

Les insectes choisis comme tests ont été des chenilles (Piérides) au cinquième âge larvaire. Ce stade représente les conditions optima requises pour les tests de lutte biologique (70) (33).

L'activité toxique des préparations est éprouvée sur des lots de 10 chenilles, par ingestion forcée et injection dans la cavité hémocœlique de 5 µl de préparation, à l'aide d'une microseringue selon des techniques inspirées de celles de Dutsky (44) et Martignoni (112).

La réduction de consommation est appréciée de la manière suivante, selon une technique mise au point par Burgerjon (34) : à chacun des individus du lot de 10 chenilles traitées (dont le poids moyen est identique) on offre une surface standard de feuille de chou (se conformant à des normes précises) dans une boîte en polystyrène de 4,2 cm de diamètre × 1,1 cm de hauteur. Un lot témoin de 10 chenilles traitées par de l'eau stérile est soumis aux mêmes conditions. La surface de la plante hôte consommée est évaluée quantitativement au moyen d'une technique photoélectrique selon le principe décrit par Bulger (32). La surface restante du feuillage offert à chaque individu est interposée entre un faisceau lumineux et une cellule photoélectrique. La mesure de la lumière transmise est une estimation directe des indices de consommation.

Les pourcentages de réduction de consommation sont exprimés en comparant la surface moyenne d'aliment consommé par individu dans chaque lot traité à la surface moyenne consommée dans des lots témoin dont les chenilles ont été traitées par 5 µl d'eau stérile, selon le rapport :

$$\text{Réduction de consommation} = 100 - \frac{100 \times \text{surface consommée par lot traité}}{\text{Surface consommée par lot témoin}}$$

Les mortalités sont évaluées sur ces mêmes lots de 10 individus aux troisième, cinquième et dixième jours suivant l'expérience.

Cette technique simple permet d'apprécier la toxicité des cristaux et des lysats enzymatiques qui en dérivent. On peut l'utiliser pour un titrage quantitatif en effectuant une série de mesures de réduction de consommation sur différents lots traités par des préparations contenant des doses décroissantes de toxine. Les pourcentages de réduction de consommation en fonction des quan-

tités de toxine administrées se répartissant sur une droite. Il est alors possible de déterminer la D 50, c'est-à-dire la dose déterminant une réduction de consomation de 50 p. 100.

Ces doses toxiques sont exprimées en µg par gramme de larve, le poids moyen des larves étant de 200 mg.

C) LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES DANS LE TEXTE

— EDTA ou versène : acide éthylène diamine tétracétique.
— PMB : parachloromercuribenzoate.
— DFP : diisopropylfluorophosphate.
— BAA : benzoyl-L-arginine amide.
— CBZ : carbobenzoxy.
— CBZ-Phe-Phe : Carbobenzoxy-Phenylalanyl-Phenylalanine.
— CBZ-Phe-Leu : Carbobenzoxy-Phenylalanyl-Leucine.
— CBZ-Try-Tyr : Carbobenzoxy-Tryptophyl-Tyrosine.
— CBZ-Ala-Leu : Carbobenzoxy-Alanyl-Leucine.
— ATEE : Ester éthylique de l'acétyl tyrosine.
— TAME : ester méthylique du p-toluène sulfonyl-L-arginine.
— DNFB : 2,4-dinitrofluorobenzène.
— DNP : dinitrophenyl.
— TCA : acide trichloracétique.
— DEAE : Diethyl-amino-éthyl.
— CM : Carboxy-méthyl.

CHAPITRE II

PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS DES PROTÉASES DE PIERIS BRASSICAE

Il ne semble pas, du moins à notre connaissance, que les protéases d'insectes aient fait jusqu'à ce jour l'objet d'une étude particulière. Nous avons pu mettre en évidence, dans le chyle le *Pieris brassicae,* la présence de deux protéases de poids moléculaire pratiquement identique et ayant de plus un certain nombre de propriétés en commun (99). Dans une première partie de ce chapitre nous décrirons la purification de ces enzymes, dont la séparation s'est révélée très difficile en raison précisément de leurs propriétés très voisines. Dans une deuxième partie nous exposerons les propriétés communes à ces deux enzymes et nous examinerons pour terminer les critères qui nous ont permis de les différencier et de contrôler la pureté des préparations obtenues.

A. — PURIFICATION

Le chyle de *Pieris,* obtenu par régurgitation spontanée, selon la technique précédemment décrite, se présente comme un liquide visqueux, très fortement coloré par des pigments verts. Ce régurgitat, dont la teneur en protéines est généralement comprise entre 15 et 20 mg/ml a un pH alcalin voisin de 9,5.

Nous avons utilisé, pour la préparation des enzymes, les techniques généralement employées, associant une précipitation (par les solvants organiques) à la chromatographie sur colonne. Les différentes étapes du fractionnement comportent successivement :

— une précipitation par le méthanol,
— un fractionnement préliminaire sur Sephadex G-75,
— la chromatographie sur échangeur d'anions, puis sur échangeur de cations.

1. — Précipitation par le méthanol

La précipitation des protéines en présence de concentrations élevées d'électrolytes ou par addition de solvants organiques est l'un des procédés de fractionnement préliminaire le plus couramment utilisé pour séparer les constituants d'un mélange très complexe.

Tableau I

Précipitation fractionnée par le méthanol

Préparation	Concentration protéines : mg/ml	Quantité totale de protéines : mg	Activité spécifique protéolyse	Activité totale
Chyle brut	17	1 250	65	78 000
0 - 30 p. 100 :				
1re extraction	3,75	94	300	29 000
2e extraction	1,2	30	400	12 000
3e extraction	0,33	7	405	2 800
				43 800
30 - 50 p. 100 :				
1re extraction	3,2	80	330	26 000
2e extraction	0,77	19	94	1 800
3e extraction	0,06	1,2	80	96
				27 896
50 - 60 p. 100 :				
1re extraction	1,3	33	121	3 300
2e extraction	0,16	3,5	100	350
3e extraction	0,065	1,3	49	65
				3 715

Précipitation effectuée sur 75 ml de chyle. Les extractions des différents précipités sont effectuées au moyen de 25 ml d'une solution de bicarbonate 0,1 M, pH 9,5.

L'addition de solvants organiques à des solutions aqueuses de protéines produit un abaissement de leur solubilité, dû à la diminution de la constante diélectrique du milieu (65). Il convient naturellement de se placer au pH minimum de solubilité (172). En général, les solvants organiques ont tendance à dénaturer les protéines, mais ces effets sont minimisés en opérant à basse température (entre 0 et — 5°).

Les solvants les plus utilisés sont les alcools, éthanol en particulier, et l'acétone. Il a été signalé (135) que dans certains cas le méthanol présente une action moins dénaturante que l'éthanol — c'est la raison pour laquelle nous l'avons utilisé ici.

Tout d'abord nous avons cherché quelle était la concentration en méthanol permettant la précipitation maximum des protéases. Des essais préliminaires de précipitation fractionnée ont été effectués à partir du chyle brut. Les résultats mentionnés dans le tableau I semblent indiquer que la plus grande partie de l'activité

protéolytique est contenue dans les fractions 0-30 p. 100 et 30-50 p. 100. L'activité est négligeable dans la fraction 50-60 p. 100. De ce fait nous réalisons une précipitation globale par le méthanol à 50 p. 100, de la manière suivante : le chyle est amené à pH 7,0 par addition du 1/10^{e} de son volume de tampon phosphate molaire et refroidi dans un bain réfrigérant à — 4°. Un volume égal de méthanol refroidi est ajouté goutte à goutte, de manière à éviter une élévation de la température qui doit se maintenir autour de — 4°. Après centrifugation, le précipité est remis en suspension dans une solution de bicarbonate 0,1 M, de pH 9,5. Après 30 minutes, on centrifuge et on garde le surnageant ; le précipité restant est traité à nouveau de la même manière. On effectue ainsi trois remises en suspension successives, de manière à extraire au maximum les enzymes. Chacun des surnageants est dialysé pendant une nuit contre le même tampon de pH 9,5 contenant de l'EDTA à la concentration 10^{-3} M. (Nous verrons plus loin que ces protéases sont très sensibles à l'action des cations divalents).

Dans le tableau II, nous indiquons une comparaison entre les résultats obtenus par une précipitation au méthanol 50 p. 100 et une précipitation par l'éthanol 50 p. 100, effectuées dans les mêmes conditions expérimentales. Ces résultats sont en faveur de la précipitation méthanolique qui permet d'obtenir des préparations plus riches en protéines et présentant une activité spécifique plus élevée.

Tableau II

Précipitation comparée : } méthanol / éthanol

Préparation	Concentration protéines mg/ml	Quantité totale de protéines mg	Activité spécifique Protéolyse	Activité totale
Ethanol 0 - 50 p. 100				
1re extraction	2,087	27	260	7 000
2e extraction	0,525	7	290	2 100
				9 100
Méthanol 0 - 50 p. 100				
1re extraction	4,8	62	270	17 000
2e extraction	1,7	22	375	8 200
				25 200

Précipitation effectuée sur 25 ml de chyle. Les extractions des différents précipités sont effectuées dans 12,5 ml d'une solution de bicarbonate 0,1 M, pH 9,5.

2. — Fractionnement préliminaire sur Sephadex G-75

Le Sephadex G-75 utilisé pour ce fractionnement permet de retenir dans les mailles du gel les protéines de poids moléculaire inférieur à 40 000. Après précipitation par le méthanol 50 p. 100, les solutions d'enzyme extraites du précipité sont concentrées par pervaporation à 2° et sont chromatographiées sur colonne de Sephadex G-75. La dimension des colonnes varie selon les quantités de protéines appliquées. Pour des quantités de l'ordre de 100 mg, nous utilisons des colonnes de 2,8 × 60 cm, pour 250 mg des colonnes de 3,5 × 70 cm.

La chromatographie est réalisée au froid et les substances sont éluées par le tampon bicarbonate 0,05 M, pH 9,5. Dans les premières fractions (figure 4) nous recueillons des protéines de haut poids moléculaire, correspondant à des pigments ; ces fractions ne présentent aucune activité enzymatique. Les protéines actives sont retardées sur la colonne et sortent dans un deuxième pic ; les fractions de ce pic (encore très légèrement pigmentées) présentent les deux activités : lyse des cristaux et protéolyse. Après ce pic d'enzyme, il reste sur la colonne des substances pigmentées en jaune, qui sortent en fin d'élution et ne manifestent aucune activité enzymatique.

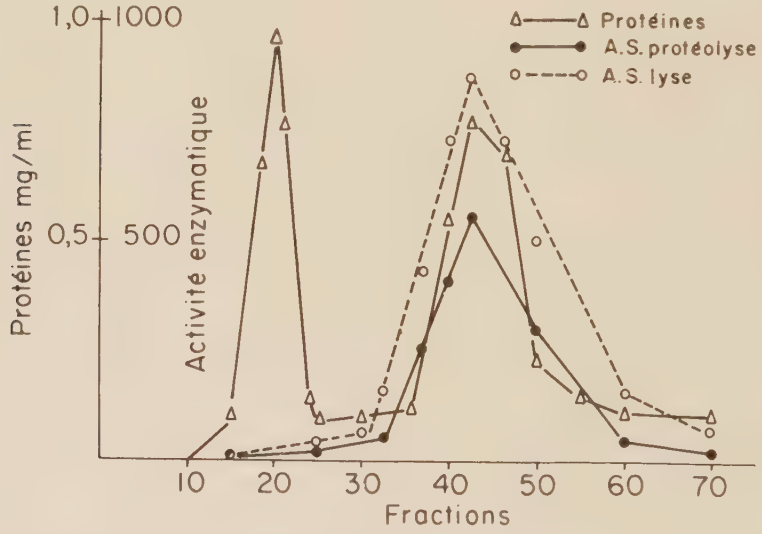


Figure 4.

Fractionnement préliminaire sur colonne de Sephadex G-75 *à pH* 9,5
Charge : 95 *mg de protéines, colonne de* 2,8 × 60 *cm.*
Température : 2°, *volume des fractions :* 5 *ml.*

Nous réalisons par cette technique de filtration sur Sephadex un fractionnement préliminaire qui nous permet d'éliminer la plus grande partie des pigments et autres protéines étrangères. D'autre part, nous pouvons avoir une première idée du poids moléculaire ; ces enzymes, retenus sur Sephadex G-75, ont vraisemblablement un poids moléculaire inférieur à 40 000. Enfin, l'activité spécifique des préparations est accrue par ce fractionnement (tableau III).

Tableau III

Etapes de la purification

Préparation	Etapes	Quantité totale protéines mg	Activité totale :		Activité spécifique : (3)		Rendement p. 100
			Protéases (1)	Lyse (2)	Protéases	Lyse	
Chyle		1 440	93 600	136 800	65	95	
Méthanol 50 p. 100 ..	I	255	76 093	104 550	298	410	82
Séphadex 75.	II	99	48 480	84 150	520	880	52
DEAE Séphadex A-50 ..	III	45	35 100	57 400	780	1 300	38
CM-cellulose	IV						
Pic 1		12,5	13 750	14 000	1 100	1 125	14,5
Pic 2		16,5	19 800	19 800	1 200	1 200	21,2

Précipitation effectuée sur 90 ml de chyle.

(1) Exprimée en unités de protéolyse.

(2) Exprimée en unités de lyse (cristaux de *B. thuringiensis*). Ces unités ont été définies dans le texte au chapitre I.

(3) Exprimée en unités enzymatiques par mg de protéines.

3. — Chromatographie sur échangeur d'ions

Nous avons poursuivi la purification des protéases par chromatographie sur échangeur d'ions dont les modalités ont été décrites.

a) Chromatographie sur échangeurs d'anions

Nous avons tout d'abord essayé le DEAE Sephadex A-50, échangeur d'anions. Le gel est mis en suspension dans l'eau en présence de laquelle il gonfle énormément. Avant son utilisation, il doit être traité de la manière suivante :

— élimination des fines particules,

— lavages sur Buchner avec HCl 0,5 N suivis de lavage à l'eau,
— traitement par NaOH 0,5 N,
— neutralisation par HCl 0,1 N, puis lavage à l'eau et par la solution tampon utilisée pour la colonne ; la régénération doit être effectuée après chaque utilisation.

Les colonnes sont préparées en versant lentement la suspension de gel dans la colonne contenant la solution tampon. On laisse sédimenter par gravité, sous faible écoulement ; lorsque la colonne est tassée, on continue à laver par la solution tampon utilisée pour l'expérience.

Pour une charge de protéines de 20 à 40 mg nous utilisons des colonnes de 1,3 × 30 cm, au-delà de 40 mg de protéines des colonnes de 2,8 × 35 cm.

Les fractions enzymatiques issues de la chromatographie sur Sephadex G-75 sont réunies, concentrées au froid, dialysées contre une solution de véronal 0,05 M de pH 8,8 et appliquée sur la colonne de DEAE Sephadex A-50 équilibrée avec cette solution. Les différentes chromatographies sont effectuées à pH élevé, dans l'espoir d'obtenir une fixation des molécules sur l'échangeur d'anions.

Pour une colonne de 1,3 × 30 cm l'élution est commencée par 25 ml de la solution de véronal 0,05 M pH 8,8, et poursuivie par un gradient de force ionique obtenu par addition de ClNa 0,5 M à la solution tampon.

Dans ces conditions, nous observons la sortie immédiate (après le volume de rétention) des fractions actives réunies en un seul pic (figure 5). Une substance absorbant à 280 mμ sort après ce pic ; il reste enfin sur la colonne les pigments dont la plus grande partie est fortement adsorbée au sommet de la colonne.

A ce pH considéré, 8,8, en milieu tamponné de force ionique 0,05 M, les enzymes ne sont pas fixés sur l'échangeur d'anions et se comportent comme des cations. Nous avons essayé d'abaisser la concentration du tampon de départ jusqu'à 0,02 M, ou d'élever le pH jusqu'à 9,5. Dans ces différents cas nous obtenons toujours le même diagramme d'élution, les enzymes se comportant encore comme des cations.

La chromatographie sur DEAE Sephadex nous a cependant permis d'éliminer des substances étrangères et surtout la totalité des pigments, dont la présence compliquait la purification. D'autre part, nous observons une augmentation de l'activité spécifique de l'ordre de 50 p. 100 (tableau III).

Enfin, nous constatons une fois de plus que les deux activités enzymatiques envisagées : activité protéolytique sur albumine, lyse des cristaux de *B. thuringiensis*, évoluent parallèlement et sont toujours présentes dans les mêmes fractions (figure 5) (fractions 5 à 12). Ces deux manifestations de l'activité enzymatique semblent donc bien être dues à la présence des mêmes enzymes.

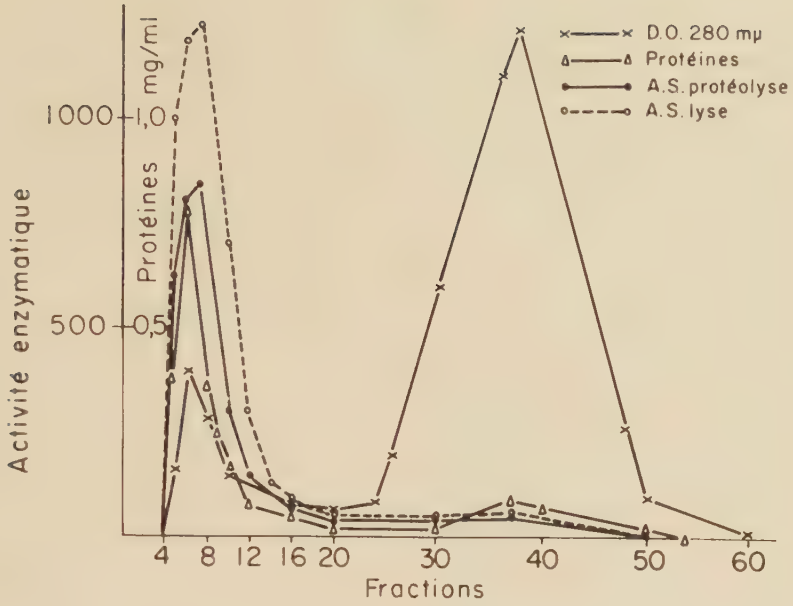


Figure 5.

Chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex A-50, *d'une préparation enzymatique partiellement purifiée* (*Stade II*). *Charge : 35 mg de protéines — colonne de* 1,3 × 35 *cm Elution à pH 8,8 avec un gradient de ClNa* 0,5 *M Volume des fractions : 3 ml.*

Nous avons essayé la chromatographie sur DEAE cellulose et ECTEOLA cellulose dans les mêmes conditions de pH et de concentration que le DEAE Sephadex. L'élution se présente de la même manière, pic d'activité sortant au début de l'élution, suivi d'un autre pic non actif. Ici encore, il n'y a pas fixation des enzymes sur échangeur d'anions. La séparation sur cellulose présente deux inconvénients : il n'y a pas élimination totale des pigments et la récupération des fractions actives est moins bonne que sur DEAE Sephadex.

Pour ces raisons, nous avons définitivement adopté la chromatographie sur DEAE Sephadex A-50 qui constitue la troisième étape de la purification.

Les substances présentant l'activité enzymatique sortent en un seul pic après chromatographie sur DEAE Sephadex, cependant ont doit constater : que ce pic est légèrement asymétrique, que l'activité des différentes fractions n'est pas constante. Ces résultats, ainsi que l'action des fractions sur différents substrats (que nous

envisagerons au paragraphe suivant), nous ont incitée à penser que ce pic pourrait contenir plusieurs protéines actives. Il était d'autre part logique de penser qu'un liquide aussi complexe que le chyle de *Pieris* puisse contenir plusieurs protéases.

b) Chromatographie sur échangeur de cations

La fixation des enzymes n'ayant pu être réalisée sur échangeur d'anions, il était nécessaire d'essayer l'utilisation des échangeurs de cations.

Pour ce faire, nous avons envisagé la chromatagraphie sur colonne de carboxyméthyl (CM) cellulose et appliqué cette technique aux fractions enzymatiques issues de la chromatographie sur échangeur d'anions.

La CM cellulose est mise en suspension dans l'eau et on élimine les fines particules par décantation. Une colonne de 1,3 cm de diamètre est remplie d'eau jusqu'à mi-hauteur et la CM-cellulose en suspension est déversée lentement dans la colonne ; on laisse sédimenter par gravité sous faible écoulement. On tasse alors la résine de manière à avoir un écoulement de 1 goutte toutes les 4 secondes et une hauteur de 15 cm. La colonne est ensuite lavée par la solution de véronal 0,02 M pH 8,6 jusqu'à équilibre de pH. Une colonne de cette dimension peut recevoir une charge de 20 à 30 mg de protéines.

Les fractions enzymatiques éluées du DEAE Sephadex sont réunies, concentrées au froid, puis dialysées pendant 4 heures contre la solution tampon utilisée pour la colonne.

L'échantillon est appliqué sur la colonne et on commence l'élution par 25 ml de la solution de véronal 0,02 M pH 8,6. On continue l'élution au moyen d'un gradient linéaire de force ionique croissante, réalisé par addition de ClNa au tampon d'origine, de manière à obtenir la concentration 0,5 M.

Avant l'adaptation de ce gradient, il sort un pic de protéines ne présentant aucune activité enzymatique. Nous observons ensuite (figure 6) la sortie des fractions actives en deux pics presque complètement séparés qui présentent tous deux une activité protéolytique du même ordre et provoquent la lyse des cristaux de *B. thuringiensis*. A ce niveau d'élution la concentration en ions atteint 0,09 M pour le premier pic et 0,1 à 0,11 M pour le deuxième pic. Ces deux pics correspondent vraisemblablement à deux enzymes distincts présentant des propriétés ioniques très voisines et, pour cette raison, difficiles à dissocier totalement. Différents essais ont été réalisés pour améliorer la séparation mais sans aucun résultat. Si on élève le pH au-delà de 8,8 la séparation est moins bonne. L'utilisation d'un gradient par palier n'améliore pas non plus la séparation, l'un des enzymes commence à sortir pour une concentration en sels de 0,08 M, le deuxième enzyme commence à sortir à la fin de ce pic avant même un changement de concentration. Nous avons donc adopté la première technique utilisant un gradient

linéaire de force ionique. La rareté du matériel enzymatique ne nous a pas permis de multiplier les essais de fractionnement.

Quoi qu'il en soit, nous obtenons de cette manière une séparation assez satisfaisante des fractions enzymatiques en deux constituants d'activité identique. Les activités spécifiques se trouvent augmentées par rapport à l'étape précédente de purification. L'activité protéolytique de 1 100 atteinte par cette chromatographie est l'activité maximum que nous ayons pu obtenir.

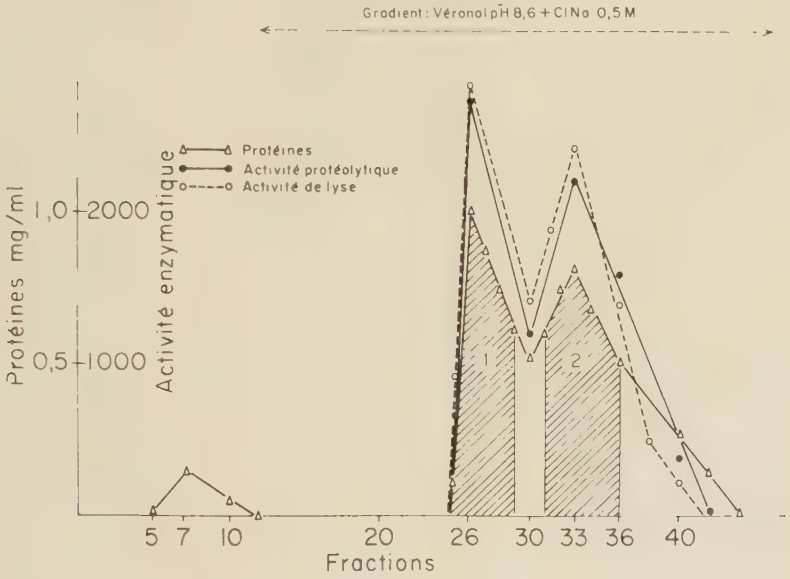


Figure 6.

Chromatographie sur colonne de CM-cellulose d'une préparation enzymatique Stade III. Charge : 30 mg de protéines, colonne de 1,3 × 15 cm Température : 2°, volume des fractions : 2,5 ml.

En conclusion, les étapes de la purification enzymatique sont au nombre de 4.

I — Précipitation méthanolique 50 p. 100,
II — Fractionnement préliminaire sur Sephadex G-75,
III — Chromatographie sur DEAE Sephadex A-50,
IV — Chromatographie sur CM-cellulose.

Les activités maxima obtenues au cours de la purification sont mentionnées dans le tableau III qui nous donne en même temps le rendement des différentes opérations.

La purification effectuée sur 90 ml de chyle brut contenant 1 440 mg de protéines permet d'obtenir en fin de chromatographie

29 mg de protéines actives, soit : 12,5 mg de l'un des enzymes et 16,5 mg de l'autre enzyme. Le rendement final, calculé d'après le rapport des activités totales est de 36 p. 100. Nous n'avons pu dépasser une purification de 20 fois.

Les quantités d'enzyme obtenues en fin de purification sont faibles, mais nous avons pu cependant réunir des quantités nécessaires pour effectuer différentes caractérisations et l'étude des propriétés.

Signalons enfin que tout au long de la purification nous observons un parallélisme satisfaisant entre les deux manifestations de l'activité : action protéolytique sur albumine et lyse des cristaux de *B. thuringiensis*.

4. — **Analyses d'ultracentrifugation sur les fractions** (*)

Pour vérifier l'état d'homogénéité des préparations enzymatiques en cours de purification, on peut utiliser l'ultracentrifugation qui permet d'obtenir une indication sur le nombre minimum de constituants d'un mélange.

Les fractions enzymatiques correspondant aux deux dernières étapes de la purification, c'est-à-dire après chromatographie sur DEAE Sephadex et après séparation sur CM-cellulose, ont été soumises à l'ultracentrifugation analytique, à la vitesse de 59 700 tours/minute à 20°.

Les fractions actives du stade III (DEAE-Sephadex) sont concentrées de manière à obtenir une préparation titrant 8,5 mg de protéines/ml. Cette solution est amenée à pH 8,0 par dialyse contre la solution de véronal 0,05 M ; l'analyse est effectuée à ce pH et pour deux concentrations d'enzymes.

La figure 7 représente les clichés obtenus après différents temps de centrifugation (2', 10', 18', 26', et 42'). La présence d'un seul pic de sédimentation permet de supposer que nous sommes en présence de 1 ou de plusieurs constituants ayant une constante de sédimentation identique. Ce pic étant asymétrique nous pouvons conclure à l'existence d'au moins deux constituants dont la constante de sédimentation moyenne est de **2,48** à 20°. Au stade suivant de purification (CM-cellulose) les pics 1 et 2 correspondant aux fractions actives séparées par cette chromatographie ont été soumises à l'ultracentrifugation. Les fractions comprises dans la zone hachurée (figure 6) ont été concentrées et nous avons obtenu des préparations (titrant 6 mg/ml en protéines) qui sont amenées à pH 8,0.

L'ultracentrifugation réalisée dans les conditions décrites ci-dessus donne pour chaque enzyme un seul pic symétrique de sédi-

---

(*) Ces analyses ont été faites au Service d'Ultra-centrifugation du C.N.R.S. dirigé par Mme Wurmser que nous remercions vivement.

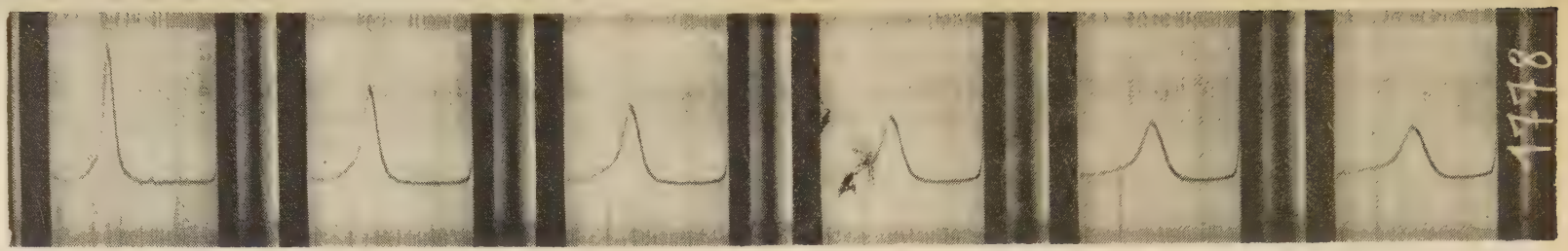


Figure 7. — *Diagramme d'ultracentrifugation d'une préparation enzymatique Stade III (DEAE Sephadex). Concentrations en protéines : 8,5 mg/ml Solution tampon de véronal 0,05 M de pH 8,0. Temps : 0,2, 10, 18, 26 et 42 mn.*

1)

2)

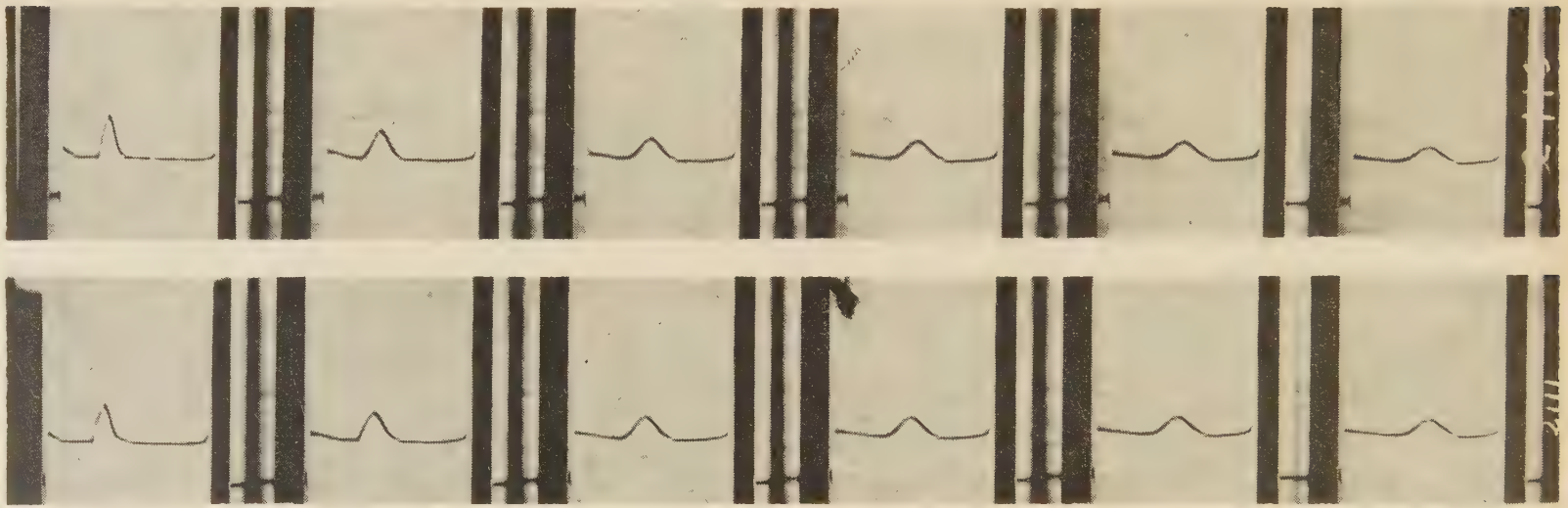


Figure 8. — *Diagrammes d'ultracentrifugation des préparations enzymatiques purifiées au Stade IV (CM-cellulose). 1) Enzyme 1 — 2) Enzyme 2. Concentration en protéines : 6 mg/ml. Solution tampon véronal 0,05 M, pH 8,0. Temps : 0, 2, 10, 18, 26 et 42 minutes.*

mentation (figure 8). Le pic 1 d'activité renferme un seul constituant apparent dont le coefficient de sédimentation à 20° est **2,48** s.

Le deuxième pic d'activité renferme aussi un seul constituant apparent dont la constante de sédimentation est **2,47** s.

Comme nous le voyons les constituants obtenus en fin de purification possédent des constantes de sédimentation très voisines et par conséquent des poids moléculaires pratiquement identiques.

En appliquant la formule de Svedberg (153) (169), d'où nous avons tiré l'équation **M = 12 900 s** (chapitre I), nous avons pu obtenir une valeur approximative du poids moléculaire de ces enzymes, soit **32 000 ± 1 000.**

B. — PROPRIÉTÉS COMMUNES AUX DEUX ENZYMES

Il était nécessaire, pour mener à bien la purification, de connaître les différentes conditions d'action des enzymes.

L'étude des propriétés a donc été commencée au début de la purification sur des préparations contenant les deux enzymes et poursuivie avec chacun des enzymes.

Nous envisagerons successivement l'influence du pH sur l'action enzymatique et sur la stabilité des préparations, l'action de la température, des ions et de différents inhibiteurs sur les enzymes.

1. — Influence du pH sur l'activité enzymatique — pH optimum

La zone optimum d'activité est caractéristique de chaque enzyme, ou tout au moins de différents groupes d'enzymes (128).

Le pH optimum des enzymes protéolytiques se répartit en trois groupes : 1) dans la zone acide ($< 3,5$) on trouve seulement la pepsine ; 2) de pH 3,0 à 7,0 on rencontre en général les protéines activées par les groupes SH : protéases de plantes, cathepsine, protéases de champignons, etc. ; 3) les enzymes protéolytiques les plus couramment utilisés : trypsine, chymotrypsine, carboxypeptidase ont leur pH optimum compris entre 7 et 8.

Les protéases que nous étudions ici sont caractérisées par un optimum de pH très alcalin. Nous avons vu que le pH du chyle dont elles sont extraites est voisin de 9,5, ce qui laissait prévoir l'optimum dans cette zone de pH.

Nous avons effectué le dosage de l'activité protéolytique à divers pH compris entre 7,6 et 11,0. Des quantités données d'enzyme (5 et 10 µg/ml) ont été incubées avec la bovalbumine dénaturée; le dosage est effectué selon la technique habituelle, mais en milieu tamponné par du borate de molarité 0,05.

Cette série de dosages a été réalisée d'abord avec une préparation partiellement purifiée (stade Sephadex 75), puis avec chacun des enzymes après leur purification. Nous voyons que (figure 9), dans tous les cas envisagés, la zone de pH optimum se situe

entre 9,5 et 10,7 avec un maximum à 10,5 pour le mélange des deux enzymes. Pour chacun des deux enzymes les résultats sont pratiquement identiques, il existe seulement de très légères différences : l'enzyme 1 (*), après séparation sur CM-cellulose, présente l'activité maximum à pH 10,0 alors que pour l'enzyme 2 l'optimum est à 10,7.

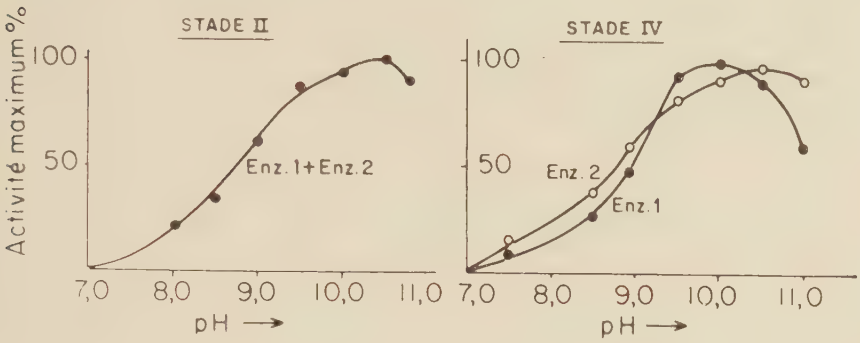


Figure 9.

Activité enzymatique des protéases de Pieris en fonction du pH. Les dosages de l'activité protéolytique sur albumine bovine sont exécutés à chacun des pH envisagés.

Les diverses chromatographies réalisées en cours de purification sont effectuées au-dessous de la zone optimum, à pH 8,8 ou 8,6 en général.

2. — **Stabilité**

L'une des premières propriétés à étudier était la stabilité des préparations enzymatiques à divers pH d'une part et à différentes concentrations d'autre part.

Comme beaucoup de protéines de faible poids moléculaire, les enzymes protéolytiques sont en général assez stables dans les limites de pH qui leur sont favorables. Tel est le cas des enzymes que nous étudions ici.

a) Nous avons tout d'abord étudié les conditions de *stabilité de l'enzyme en fonction du pH.*

Pour ce faire, nous avons maintenu une préparation enzyma-

(*) Nous appellerons désormais enzyme 1 les fractions actives correspondant au 1er pic élué à la suite de la chromatographie sur CM-cellulose et enzyme 2 les fractions correspondant au 2e pic actif.

tique dont la concentration en protéines est de 0,084 mg/ml à 25° pendant 4 heures à différents pH compris entre 7,2 et 10,5 en milieu tamponné. Un témoin à pH 9,5 est conservé à 2° pendant ce temps. On effectue ensuite des prélèvements dans chacune de ces préparations et on dose l'activité protéolytique. Le tableau IV nous montre l'évolution de l'activité à ces différents pH. Nous pouvons constater que le maximum de stabilité se situe autour de pH 9,2, toutefois à pH 7,2 on conserve encore 79 p. 100 de l'activité. Nous voyons aussi que le tampon bicarbonate ou le véronal semblent mieux convenir que le tampon glycine-NaOH.

Tableau IV

Stabilité des préparations enzymatiques à différents pH (Stade II de purification)

pH	Véronal M/20				Bicarbonate M/20 Na			Glycine-NaOH M/20		
	7,2	8,0	8,8	9,2	9,2	9,5	10,5	9,2	9,5	10,5
Activité spécifique	541	556	660	714	730	660	626	680	660	541

Activité de l'enzyme conservé à pH 9,5 et à 2° : 657.

La préparation enzymatique est maintenue aux différents pH pendant 4 heures à 25°. L'activité enzymatique est ensuite mesurée par le dosage de l'activité protéolytique sur albumine bovine à pH 9,5.

Quoi qu'il en soit, la préparation enzymatique à ce stade de purification est encore très stable. Il n'en est plus de même, aux stades terminaux, où il suffit de laisser les solutions d'enzymes pendant quelques minutes à la température du laboratoire, pour observer une inactivation importante.

b) *Stabilité en fonction de la concentration en enzymes*

La stabilité des enzymes en solution varie en général selon leur concentration. La même préparation enzymatique partiellement purifiée utilisée pour l'expérience précédente a été employée pour étudier la stabilité en fonction de la concentration des protéines en solution. La préparation est maintenue pendant 4 heures à la température du laboratoire, en milieu tamponné (bicarbonate 0,05 M de pH 9,5), à des concentrations comprises entre 16 et 840 µg/ml (tableau V). L'activité enzymatique est inchangée jus-

qu'à la concentration de 84 µg/ml. A 40 µg on observe déjà une perte d'activité de 30 p. 100. Les préparations enzymatiques en cours de purification sont donc relativement stables et on peut les conserver pendant plusieurs semaines à — 15° sans observer aucune perte d'activité. Il convient de signaler que chaque décongélation est accompagnée d'une diminution de l'activité pouvant aller de 10 à 25 p. 100 selon les étapes de purification.

Tableau V

Stabilité en fonction de la concentration en enzyme à pH 9,5

Concentration de l'enzyme : Protéines mg/ml	0,84	0,42	0,168	0,084	0,042	0,016
Activité spécifique	584	590	562	555	416	425
Activité résiduelle p. 100	100	100	95	92	70	70

La préparation enzymatique aux différentes concentrations envisagées est maintenue pendant 4 heures à 25°, au pH 9,5.

L'activité enzymatique est ensuite estimée par le dosage de l'activité protéolytique sur albumine bovine à pH 9,5.

3. — Action de la température

La résistance des enzymes protéolytiques à la chaleur est assez variable. La trypsine est stable à 40° en présence de calcium (37), la cathepsine C résiste à la température de 65° pendant 40 minutes (105). La résistance à la chaleur dépend aussi des conditions expérimentales.

a) Dans un premier temps, nous avons suivi les variations de l'activité des enzymes de *Pieris*, en fonction des températures de chauffage, avec des préparations partiellement purifiées (stade II - Sephadex 75), puis avec chacun des enzymes en fin de purification.

Les différentes préparations, à des concentrations de l'ordre de : 60 µg/ml sont portées pendant 10 minutes aux températures suivantes : 40, 50, 50 et 55°. Ces préparations sont alors refroidies dans un bain de glace et des prélèvements sont faits dans chacun des cas pour déterminer les activités enzymatiques.

Nous remarquons sur la figure 10 l'inactivation totale des préparations à partir de 50°, même lorsqu'il s'agit de la préparation

partiellement purifiée. A 40° on conserve 80 à 85 p. 100 de l'activité, la demi-dénaturation se situe entre 40 et 45°.

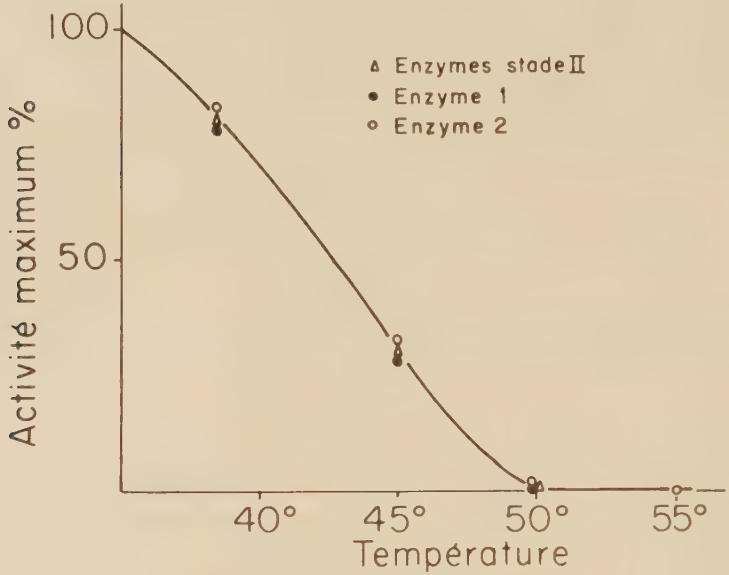


Figure 10.

Influence de la température sur l'activité enzymatique des protéases de Pieris.
Les dosages de l'activité protéolytique sur albumine bovine sont effectués après chauffage des différentes préparations, pendant 10 minutes, aux températures considérées.

b) Dans une deuxième série d'expériences nous avons étudié la résistance des mêmes préparations, en fonction des temps de chauffage à une température donnée, qui est celle de la demi-dénaturation. D'après les résultats de la figure 10, nous avons choisi 43° comme température de demi-dénaturation. Les différentes préparations enzymatiques sont portées à cette température pendant une durée totale de 40 minutes. A chacun des temps suivants : 5, 10, 20 et 40 minutes on fait des prélèvements qui sont refroidis dans un bain de glace et utilisés pour le dosage des deux activités enzymatiques.

Les résultats sont alors exprimés (figure 11) en portant le logarithme des activités en fonction des temps de chauffage. L'examen de cette figure correspondant à la préparation partiellement purifiée, donc contenant les 2 enzymes, nous permet de constater deux phénomènes :

1° la décroissance régulière du logarithme de l'activité en fonction du temps de chauffage selon une droite à une seule pente.

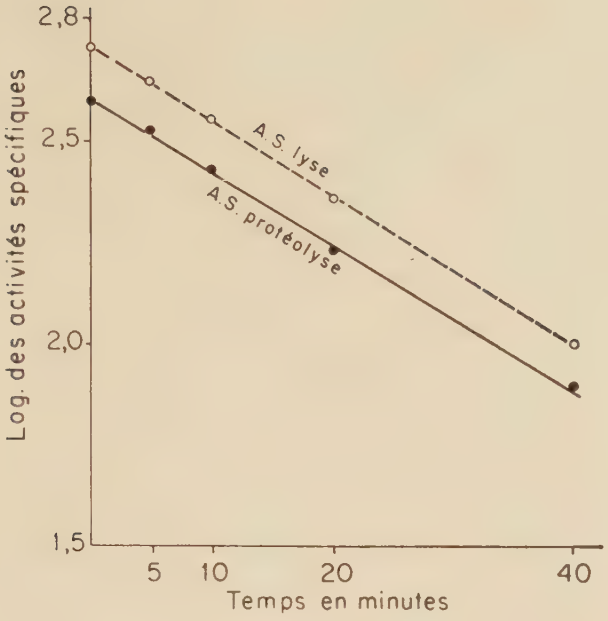


Figure 11.

Dénaturation thermique d'une préparation enzymatique au Stade II, en fonction du temps de chauffage à 43° (température de demi-dénaturation).

2° le parallélisme étroit entre l'évolution des deux activités enzymatiques : protéolyse sur albumine et lyse des cristaux de *B. thuringiensis.*

L'existence d'une droite à une seule pente (qui exclut d'ailleurs les phénomènes possibles d'autolyse) nous a longtemps induite à penser que notre préparation contenait un seul enzyme, jusqu'au moment où nous avons obtenu une séparation en deux constituants sur CM-cellulose. Il nous restait à admettre que les deux enzymes obtenus devaient présenter des thermorésistances identiques.

Nous avons pu le démontrer en réalisant la même expérience de dénaturation en fonction du temps de chauffage à 43° sur chacune des préparations. Si nous portons sur un même graphique (figure 12) l'évolution du rapport $\text{Log} \frac{A}{A_0}$ (A_0 = activité spécifique initiale et A = activité au temps considéré) en fonction du temps, nous obtenons pour chacun des deux enzymes des droites de pente pratiquement identique.

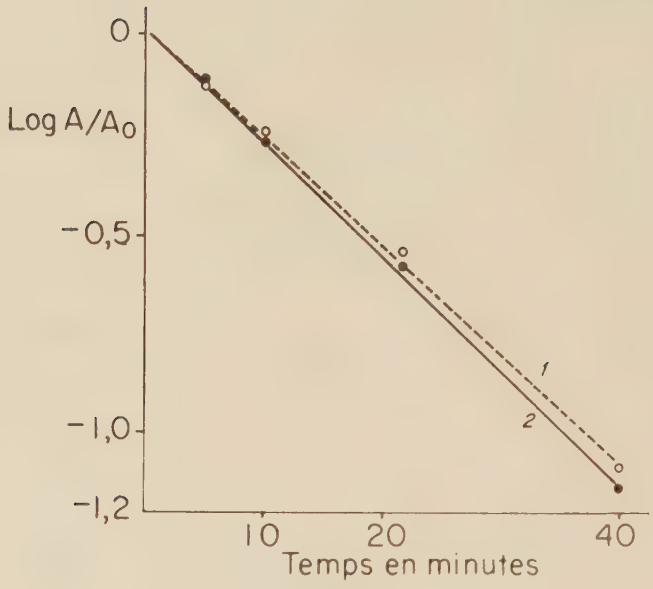


Figure 12.

Dénaturation thermique de chacune des protéases de Pieris, en fonction du temps de chauffage à 43° (température de demi-dénaturation).

A : activité résiduelle au temps t — A_0 : activité initiale

1 : *enzyme* 1 — 2 : *enzyme* 2.

Enfin, nous retrouvons après 10 minutes de chauffage à 43°, 50 p. 100 de l'activité initiale.

Ces résultats, ainsi que la résistance de chacun des enzymes aux différentes températures considérées dans les expériences précédentes, montrent clairement que les deux enzymes ont une résistance identique à la chaleur et ne doivent pas être portés au-delà de 40°.

4. — Action de l'urée

L'action dénaturante de l'urée sur les protéines est variable selon leur structure. Etant donné leur faible poids moléculaire, la plupart des enzymes protéolytiques sont stables (66) en présence de concentrations élevées d'urée. Selon Lineweaver et Schwimmer (105) la papaïne, par exemple, est stable pendant 24 heures à 30° dans l'urée 9 M ; la trypsine conserve encore toute son activité dans l'urée 2,5 M.

Nous avons soumis une préparation partiellement purifiée des

protéases de *Pieris* à l'action de l'urée pendant 4 heures à 25°. Les concentrations d'urée sont comprises entre 2 M et 8 M. L'urée est éliminée par dialyse pendant une nuit, au froid, puis les dosages d'activité sont ensuite effectués dans chacun des cas. Aucune inactivation (figure 13) ne survient en présence d'urée 2 M. Avec l'urée 4 M il reste 66 p. 100 de l'activité, qui devient presque nulle en présence d'urée 8 M. La résistance de ces enzymes à l'urée est comparable à celle de la trypsine.

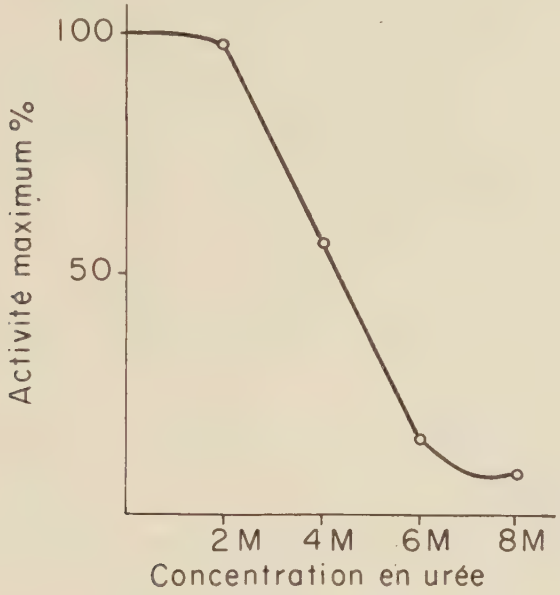


Figure 13.

Action de l'urée sur une préparation enzymatique partiellement purifiée (Stade II).

Le dosage de l'activité protéolytique sur albumine est réalisé avec des parties aliquotes de la préparation enzymatique préalablement soumises à l'action de l'urée.

5. — **Action des ions métalliques**

Nous avons dû envisager, dès le début de la purification, l'influence des ions sur nos préparations enzymatiques. Nous savons en effet que les protéases sont particulièrement sensibles aux ions métalliques ; cette action se manifestant soit par une activation, soit par une inhibition. L'action protectrice et activatrice du calcium sur la trypsine et la chymotrypsine est bien connue (105) (65). Green et coll. (67) (68) ont montré l'activation par les ions : Mn^{++} Cd^{++} et Co^{++} de l'hydrolyse du benzoyl arginine éthyl ester par

la trypsine. L'action des métaux lourds : Ag^{++}, Cu^{++}, Hg^{++}, Pb^{++}, Fe^{++} se traduit en général par une inhibition totale ou partielle de nombreuses protéases. Green et Neurath (68) signalent l'inhibition totale de la trypsine par Cu^{++}, Hg^{++}, Ag^{++} et partielle par Zn^{++}. Des protéases bactériennes (47) sont inhibées par Cu^{++} Fe^{++} et Hg^{++}. De plus Labouesse a montré (96) que la clostripaïne* est inhibée totalement par Zn^{++}, Fe^{++}, alors que les peptidases sont en général activées par Zn^{++}.

L'action des ions sur les protéases de *Pieris* a été expérimentée au début de la purification sur une préparation stade II, (Sephadex 75) puis sur chacun des enzymes obtenus après chromatographie sur CM-cellulose. Les différentes préparations enzymatiques amenées à la concentration de 16 µg/ml en milieu tamponné de pH 9,5 sont mises en présence des ions métalliques indiqués dans le tableau VI, pendant 1 heure. Les dosages d'activité : protéo-

Tableau VI

Action des ions sur les préparations enzymatiques

Sels métalliques	Concentration finale des ions	Activité résiduelle : protéolyse p. 100			Activité résiduelle : lyse des cristaux de *B. thuringiensis*		
		Préparation (T) (1)	Enzyme 1	Enzyme 2	Préparation (T)	Préparation 1	Préparation 2
SO_4Mn	10^{-4} M	90	73	87	88		86
Citrate ammoniaco-ferrique	10^{-3} M	82	83	68	83	80	75
Cl_2Ca	10^{-3} M	67	76	67	69	70	70
SO_4Mg	10^{-3} M	56	75	55	60	71	58
Cl_2Co	10^{-3} M	55	66	45	57	69	46
Cl_2Ni	10^{-3} M	40	46	64	38	40	60
SO_4Cu	10^{-3} M	0	0	9	0	0	8
SO_4Zn	10^{-3} M	0	0	0	0	0	
Cl_2Zn	10^{-3} M	0	0	5	0	0	2
Cl_2Hg	10^{-3} M	26	47	30	1	43	25
Enzyme seul ..		100			100		

Concentration de l'enzyme mis en présence des ions : 16 µg/ml pendant 1 heure à 25°.

(1) La préparation T est une préparation Stade II, contenant les deux enzymes.

(*) Enzyme extrait de cultures de *Clostridium perfringens*.

lyse et lyse des cristaux de *B. thuringiensis* sont ensuite exécutés dans chacun des cas.

Nous observons l'inactivation totale par Cu^{++}, Zn^{++} et l'inactivation importante par Hg^{++} spécialement pour l'enzyme 2. Les autres cations considérés inactivent partiellement chacun des deux enzymes selon des rapports très voisins. Des différences sensibles ont pu être observées entre les enzymes en ce qui concerne l'action des ions Mg^{++}, Hg^{++} et Co^{++}. D'une manière générale, il semble que l'enzyme 2 soit plus sensible que l'enzyme 1 aux différents cations qui inactivent partiellement les préparations.

Alors que la trypsine ou la chymotrypsine sont stabilsées par le Ca^{++} nous observons pour ces protéases une inactivation par Ca^{++} qui est de l'ordre de 30 p. 100.

Nous voyons que la plupart des cations sont inhibiteurs des protéases d'insectes, Mn^{++} étant le moins inactivant. Pour cette raison, nous avons dû effectuer les préparations et les dosages de l'activité en présence d'EDTA qui n'exerce lui-même aucune action inhibitrice. Le rôle protecteur de l'EDTA exclut, en outre, l'existence d'un ion métallique activateur de ces enzymes.

Enfin, nous constatons encore le comportement presque similaire des deux activités enzymatiques vis-à-vis des ions envisagés.

6. — **Action de la cystéine et de différents inhibiteurs**

L'action activatrice de la cystéine sur la papaïne et d'une manière générale sur les protéases des plantes (14) ou sur la clostripaïne (96) est bien connue. Nous avons voulu vérifier s'il en était ainsi pour les protéases de *Pieris* et si des groupements -SH-jouaient un rôle dans l'action enzymatique. C'est pourquoi nous avons étudié l'action de la cystéine et du paramercuribenzoate à diverses concentrations sur nos préparations.

Nous avons enfin essayé l'action du diisopropyfluporophosphate, inhibiteur de nombreuses protéases. Une expérience identique à celles qui ont été réalisées avec les ions est exécutée sur la préparation Stade II (Sephadex 75) qui est mise en présence de cystéine, de PMB et de DFP à plusieurs concentrations, pendant 1 heure. Les dosages de l'activité sont effectués dans chacun des cas. Nous voyons (tableau VII) que la cystéine ne produit aucune activation même à la concentration de 10^{-2} M. Le PMB est aussi sans action sur notre préparation. L'absence d'inhibition par ce réactif qui bloque les groupements -SH libres des protéines semble exclure la participation d'un groupement -SH dans la catalyse enzymatique. Pour une concentration descendant jusqu'à 10^{-5} M, le DFP inhibe totalement les deux activités enzymatiques; son action est instantanée et il suffit de l'ajouter au cours des dosages enzymatiques pour bloquer la réaction. En effet, le DFP inhibe la plupart des enzymes protéolytiques (12) (126) en se combinant de manière irréversible aux groupements -OH de la sérine pré-

sents dans le centre actif (45). Il suffit d'une molécule de DFP par molécule de trypsine ou de chymotrypsine pour provoquer l'inactivation totale et irréversible de ces enzymes.

Tableau VII

Action de la cystéine, du PMB et du DFP

Réactifs	Concentrations finales	Activités résiduelles p. 100	
		Protéolyse	Lyse des cristaux de *B. thuringiensis*
Cystéine	10^{-4} M	100	
	10^{-3} M	100	
	10^{-2} M	100	
PMB	10^{-4} M	100	100
	10^{-3} M	105	100
DFP	10^{-5} M	25	15
	10^{-4} M	0	0
	10^{-3} M	0	0

Concentration de l'enzyme mis en présence des réactifs pendant 1 heure : 16 µg/ml.

L'action de ces réactifs est expérimentée sur une préparation Stade II comportant les deux enzymes.

7. — Action de l'inhibiteur de trypsine

Il nous a semblé intéressant, étant donné l'origine des protéases que nous étudions ici, d'expérimenter l'action de l'inhibiteur spécifique de trypsine : l'inhibiteur extrait du soja. Nous savons que cet inhibiteur (93) qui est une protéine de PM = 24 000, se combine stoechiométriquement avec la trypsine, dont il bloque le centre actif, et inhibe totalement l'activité (165). Cet inhibiteur qui peut être extrait de différents organismes agit spécifiquement sur la trypsine et s'est révélé sans action sur d'autres protéases (protéases de sérum mise à part).

Nous avons essayé l'action de l'inhibiteur de soja toujours sur des préparations partiellement purifiées (Stade Sephadex 75), en réalisant les dosages selon la technique habituelle, mais en présence de l'inhibiteur à diverses concentrations. Ces concentrations sont choisies de manière à avoir un rapport inhibiteur/enzyme variant de 3,5 à 35. Un témoin trypsine est traité de la même

manière. Nous observons (tableau VIII) une inhibition importante de notre préparation enzymatique. Cette inhibition est proportionnelle aux concentrations en inhibiteur et atteint 75 p. 100 pour les concentrations les plus élevées, alors que dans le cas de la trypsine, l'inhibition est totale pour les plus faibles concentrations.

Tableau VIII

Action de l'inhibiteur de trypsine

Enzymes	Concentration inhibiteur : µg/ml	Rapport : Inhibiteur / enzyme	Inhibition : p. 100	
			Protéolyse (1)	Lyse (2)
Trypsine 7 µg	25	3,5	100	
	50	7	100	
	125	17,5	100	
Enzymes *Pieris* (Préparation Stade II) : 7 µg	25	3,5	30	28
	50	7	43	40
	125	17,5	60	59
	250	35	75	80
Enzyme 1 : 7 µg	25	3,5	30	29
	50	7	45	42
	125	17,5	50	48
	250	35	50	49
Enzyme 2 : 7 µg	25	3,5	37	35
	50	7	60	62
	125	17,5	80	63
	250	35	80	82

Le dosage des activités enzymatiques :

(1) Activité protéolytique sur albumine bovine.

(2) Lyse des cristaux de *B. thuringiensis*, sont effectués en présence de l'inhibiteur ajouté au temps 0 de la réaction.

Si nous envisageons l'action de l'inhibiteur sur chacune des protéases, dans les mêmes conditions que ci-dessus, nous observons alors que l'inhibition de l'enzyme 2 (80 p. 100) est plus importante que celle de l'enzyme 1 (50 p. 100). Dans les deux cas l'inhibition n'est pas stoechiométrique et est proportionnelle aux concentrations d'inhibiteur.

Ces résultats suggèrent une certaine analogie entre la trypsine et les enzymes de *Pieris*, analogie qui sera confirmée par l'étude de la spécificité.

Il est surtout intéressant de remarquer une fois de plus le parallélisme de l'inhibition des deux activités enzymatiques : protéolyse sur l'albumine et lyse des cristaux de *B. thuringiensis*. Sans aucun doute possible, ces résultats et ceux qui ont été signalés dans les paragraphes précédents permettent d'affirmer que la lyse des cristaux de *B. thuringiensis* est due à une réaction de protéolyse.

Conclusions : Nous venons d'exposer un ensemble de propriétés chimiques des protéases de *Pieris* qui traduisent une similitude étonnante entre les deux enzymes dont la présence a été révélée par chromatographie sur CM-cellulose : similitudes de pH optimum, de résistance à la chaleur, de comportement vis-à-vis des inhibiteurs, de constante de sédimentation. Similitudes telles, que nous en avions conclu, au début de cette étude, à la présence d'un seul enzyme. Dans la troisième partie de ce chapitre nous allons maintenant envisager les propriétés qui confirment l'existence de deux enzymes et ont permis de caractériser chacun d'entre eux.

C. — PROPRIÉTÉS PERMETTANT DE CARACTÉRISER LES DEUX ENZYMES

L'action de préparations enzymatiques, à différents stades de purification, sur des substrats synthétiques et l'étude de ces préparations par électrophorèse ou par des techniques immunochimiques nous ont permis de différencier les deux protéases et de caractériser chacune d'elles.

1. — Différenciation des protéases par leur action sur deux substrats synthétiques

Nous avons vu que la chromatographie sur DEAE Sephadex (Stade III) permet d'éluer un seul pic de protéines présentant l'activité enzymatique et nous cherchions à savoir si une ou plusieurs protéases étaient en cause. Nous avons alors envisagé l'action de différentes fractions de ce pic actif, sur des substrats synthétiques correspondant à deux types différents de spécificité : le benzoyl-arginine amide (BAA) et le CBZ-phenylanalyl-phenylalanine (CBZ-Phe-Phe).

Ces substrats, à la concentration $2{,}5.10^{-3}$ M, ont été mis en présence des différentes fractions enzymatiques. Nous avons choisi des concentrations élevées d'enzyme : 60 µg, de manière à pouvoir déceler même une hydrolyse faible. L'incubation est réalisée en milieu tamponné (bicarbonate 0,05 M, pH 10,5) à 35° pendant 1 heure. Les dosages de l'activité amidasique ou peptidasique sont effectués selon la technique décrite (chapitre I). Nous voyons alors que (figure 14 a) les fractions enzymatiques considérées

réagissent différemment sur chacun des deux substrats. Alors que la fraction 5 est active sur BAA et inactive sur CBZ-Phe-Phe, la fraction 12 est beaucoup moins active sur BAA et très active sur CBZ-Phe-Phe. La fraction 10 est encore active sur BAA et commence à agir sur CBZ-Phe-Phe. Autrement dit, nous avons pour un seul pic de protéines deux activités enzymatiques différentes. Ces résultats indiquent clairement l'hétérogénéité des fractions de ce pic et par conséquent la présence de deux enzymes différents (100).

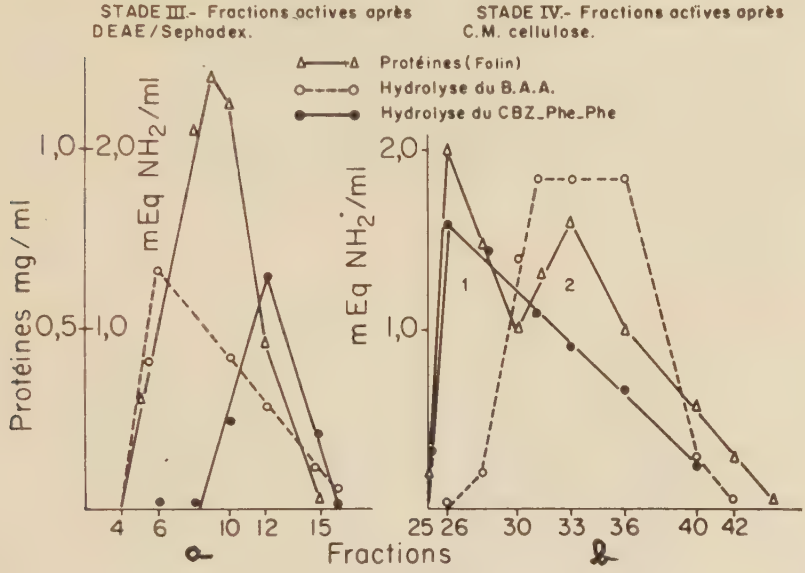


Figure 14.

Différenciation des protéases de Pieris par leur action sur des substrats synthétiques. L'hydrolyse des substrats (concentration $2{,}5.10^{-3}$ M) est estimée par le dosage des groupements NH_2 libérés après 1 heure d'incubation à 35°.

Nous avons poursuivi la purification, l'étape suivante : chromatographie sur CM-cellulose (stade IV) devait nous permettre de séparer deux constituants. L'action des différentes fractions de ces deux pics actifs a été examinée sur chacun des substrats, dans les conditions indiquées ci-dessus. Comme il fallait s'y attendre, nous constatons (figure 14 b) que la dissociation des deux types d'activité évolue parallèlement au fractionnement sur CM-cellulose. Les premières fractions (qui étaient les dernières sur DEAE Sephadex) sont maintenant actives sur CBZ-Phe-Phe, alors que les fractions du deuxième pic sont actives sur BAA. Les maximum d'activité correspondent au sommet des pics. A l'endroit où

les deux pics se rejoignent nous avons des fractions actives sur les deux substrats, donc qui renferment les deux enzymes.

Les concentrations élevées d'enzyme utilisées nous permettent de mettre en évidence dans certaines fractions la présence des deux enzymes, même si l'un des deux est présent à l'état de traces.

Les dernières fractions du deuxième pic actif présentent encore une légère activité sur CBZ-Phe-Phe. Il est possible que des traces du premier enzyme soient encore restées, mais nous savons que la trypsine a la possibilité d'hydrolyser faiblement les substrats de la chymotrypsine et réciproquement (79) (82). Il se pourrait donc que l'enzyme 2 soit faiblement actif sur le substrat de l'enzyme 1. Quoi qu'il en soit, les mesures de l'activité sur BAA et CBZ-Phe-Phe de différentes fractions enzymatiques en cours de purification montrent sans aucun doute possible que les protéases séparées par chromatographie et identifiées par électrophorèse sont actives sur des substrats différents. L'un des enzymes doit hydrolyser les liaisons basiques et serait donc du type trypsine, l'autre agirait au niveau des liaisons aromatiques et serait alors du type chymotrypsine.

2. — Propriétés électrophorétiques

Au moyen des différentes techniques d'électrophorèse décrites dans le précédent chapitre, nous avons pu suivre la composition des fractions enzymatiques obtenues au cours de la purification et identifier ainsi les constituants.

a) Gel d'amidon

La technique de Smithies (159) (160) a été appliquée à des préparations partiellement purifiées et à chacun des enzymes.

Les électrophorèses sont réalisées à pH 8,6 sur gel à l'urée 6 M. Il est en effet signalé que la présence de l'urée dans le gel permet une meilleure séparation des protéines (161) (141), spécialement lorsqu'il s'agit de molécules ayant des propriétés très voisines. Nous n'avons donc utilisé que le gel à l'urée, ce qui était d'autant plus nécessaire que nous avions des protéines basiques dont la séparation est toujours difficile à réaliser par électrophorèse.

Une première expérience, réalisée avec une préparation au stade II (Sephadex 75) (dans le sens horizontal, avec une durée de 18 heures et une charge de 5 V/cm) nous révèle (figure 15 a) la présence d'au moins trois constituants protéiques migrant tous vers la cathode. Nous les avons numérotés par ordre de mobilité croissante ; il s'agit de protéines basiques. Dans ces mêmes conditions, une autre expérience a été réalisée : chacune des préparations enzymatiques après la chromatographie sur CM-cellulose a été déposée sur une même plaque (figure 15 b). Nous retrouvons alors un seul constituant pour chaque enzyme.

Le constituant 1 correspond aux fractions du premier pic

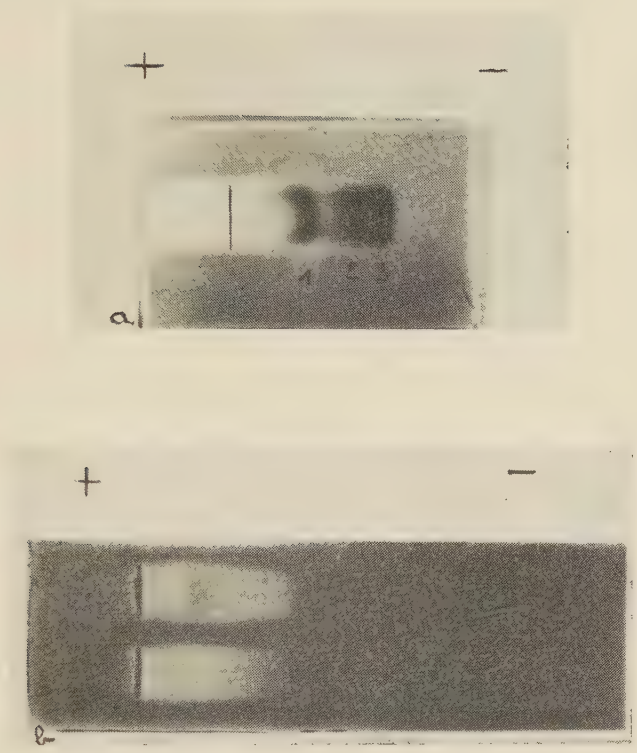


Figure 15.

Electrophorèse sur gel d'amidon des préparations enzymatiques de Pieris à différentes étapes de la purification

a) *Préparation partiellement purifiée au Stade II.*

b) *Enzymes purifiés au Stade IV : enzyme* 1 (*en haut de la plaque*), *enzyme* 2 (*en bas*).

Gel à l'urée 6 *M de pH* 8,6 — 5 *Volts par cm* — 18 *heures.*

actif après séparation sur CM-cellulose, cet enzyme qui est le premier élué sur échangeur de cations est aussi celui qui migre le moins vers la cathode. Le constituant 2 correspond aux fractions du deuxième pic actif après CM-cellulose, la charge négative qu'il

porte est supérieure à celle du premier constituant qui le précède au cours de l'élution et il est normal que la migration vers la cathode soit plus importante. Ces différents résultats sont concordants et montrent clairement que nous avons deux protéases présentant des mobilités différentes en électrophorèse dans les conditions définies ci-dessus.

Enfin, la présence d'un seul constituant dans chaque préparation, au stade final de la purification, permet de confirmer les résultats obtenus par ultracentrifugation, en ce qui concerne l'homogénéité des préparations.

Cette technique d'électrophorèse sur amidon nécessite des concentrations importantes de protéines (de l'ordre de 10 mg) et il nous a été difficile d'obtenir ces concentrations en fin de préparation, c'est pourquoi les taches obtenues dans les derniers clichés sont insuffisamment révélées, d'autre part les protéines de faibles poids moléculaires, telles les protéases, se révèlent difficilement par l'amidoschwartz.

b) Electrophorèse sur gélose et révélation spécifique de protéases

Parallèlement à ces expériences sur gel d'amidon, nous avons exécuté des électrophorèses sur gélose. Nous désirions confronter les résultats obtenus par ces deux techniques différentes et éliminer s'il en était besoin les artefacts qui auraient pu être introduits par la présence d'urée dans le gel d'amidon.

Nous avons utilisé la technique de Grabar (64) et Uriel (177) décrite dans le chapitre précédent.

Les expériences sont encore réalisées à pH 8,6 en tampon véronal de force inonique 0,05, la durée de migration est de 3 heures dans un champ de 5 V/cm. La caractérisation des protéases est effectuée après électrophorèse sur les plaques recouvertes d'un film de caséine. Après 2 heures d'incubation à 37°, les enzymes protéolytiques ont digéré la caséine et sont directement mis en évidence sur la plaque. Cette technique est très sensible et permet de localiser des enzymes qui seraient insuffisamment révélés par la simple technique de coloration.

Nous remarquons que sur la figure 16 a, obtenue avec une préparation au stade II (Sephadex 75), les taches incolores se détachant sur fond sombre correspondent à l'emplacement des protéases. Les taches correspondant aux deux enzymes sont difficilement séparables, mais on peut cependant distinguer deux zones d'activité. Une même préparation, sans incubation sur caséine (16 b) permet de localiser deux taches, donc deux protéines. Nous voyons que ces enzymes qui sont des protéines basiques ont tendance à traîner sur la gélose et la séparation sur gel d'amidon à l'urée est nettement meilleure.

L'enzyme 1, après séparation sur CM-cellulose, donne une seule tache après révélation de protéines (17 b) et après digestion

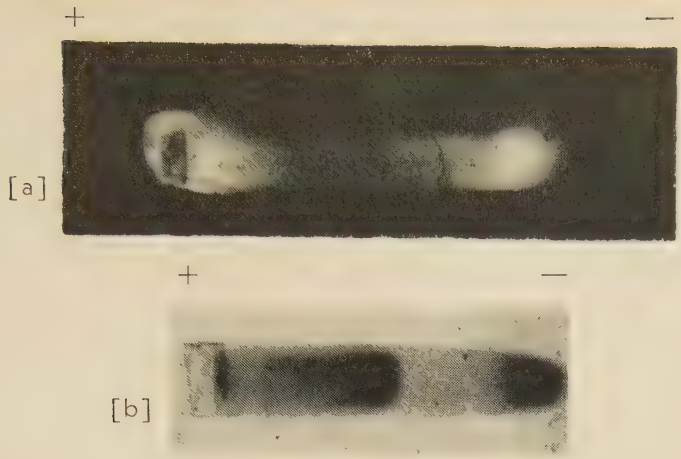


Figure 16.

Electrophorèse sur gélose d'une préparation enzymatique partiellement purifiée (Stade II).

a) *Mise en évidence de l'activité protéolytique sur la plaque de gélose recouverte d'un film de caséine.*

b) *Révélation des protéines à l'amidoschwartz, pH de l'expérience : 8,6 — 3 heures — 5 volts/cm.*

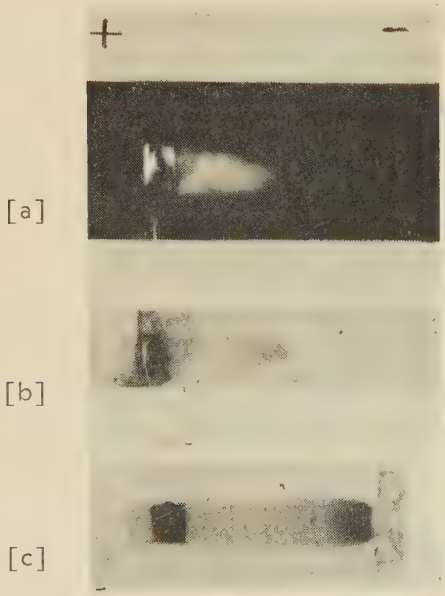


Figure 17.

Electrophorèse sur gélose des enzymes purifiés au stade IV. pH 8,6 — 3 heures — 5 volts/cm.

a) *Mise en évidence de l'activité protéolytique de l'enzyme 1 sur la plaque de gélose recouverte d'un film caséine.*

b) *Révélation de protéines (enzyme 1) par l'amidoschwartz.*

c) *Révélation de protéines (enzyme 2) par l'amidoschwartz.*

de la caséine (17 a). La mobilité de cet enzyme est toujours inférieure à celle du deuxième enzyme qui se trouve être toujours le plus déplacé (17 c).

Ces quelques observations nous confirment encore la présence de deux protéases qui sont des protéines basiques, différant par leur mobilité électrophorétique.

c) Caractérisation des protéases sur plaque de gélose par leur action sur des substrats synthétiques

Nous avons vu que les protéases agissent différemment sur les deux substrats synthétiques envisagés : BAA et CBZ-Phe-Phe.

Pour caractériser chacun des enzymes après électrophorèse, il nous suffisait de pouvoir éluer les fractions de gélose et d'examiner l'action des éluats sur chacun de ces deux substrats.

Nous avons alors réalisé cette expérience avec les préparations qui contiennent les deux enzymes et avec chacun des enzymes.

1) *Conditions expérimentales*

La plaque de gélose soumise à l'électrophorèse est coupée en cubes de 0,5 cm de côté.

L'une des moitiés est conservée pour la révélation de protéines à l'amidoschwartz. L'autre moitié est découpée tranversalement en cubes de 0,5 cm de largeur.

Chacun de ces éluats est déposé dans un tube à essai et on y ajoute 1 ml d'une solution de bicarbonate 0,1 M de pH 9,5. On laisse pendant 24 heures à la chambre froide. Les différents éluats sont alors centrifugés et les surnageants sont utilisés pour les dosages d'activité. Nous avons 12 éluats. 0,4 ml de chacun de ces éluats sont mis en présence de BAA d'une part et de CBZ-Phe-Phe d'autre part à la concentration $2{,}5.10^{-3}$ M en milieu tamponné de pH 10,5. L'incubation est réalisée à 35° pendant 1 heure. Les dosages à la ninhydrine sont exécutés sur 0,1 ml de chaque milieu de réaction.

2) *Résultats*

Les résultats sont exprimés quantitativement en équivalents NH_2 (µMole) libérés par ml du milieu réactionnel. Dans une première expérience (figure 18 a) nous voyons que l'activité enzymatique se répartit en deux régions de la plaque de gélose ; les éluats 3 à 6 sont actifs sur CBZ-Phe-Phe, les éluats 8 à 12 sont actifs uniquement sur BAA. Les deux zones d'activité correspondent à chacun des deux enzymes qui se trouvent donc bien séparés par l'électrophorèse. La révélation de protéines sur la deuxième moitié de la même plaque nous permet de contrôler ces résultats (16 b). Les différentes zones d'activité correspondent à l'emplacement des différentes protéines.

La même expérience a été réalisée avec chaque préparation enzymatique purifiée.

Dans ces conditions, l'enzyme 1 (figure 18 b) est seulement actif sur CBZ-Phe-Phe. Les éluats 3 à 6 correspondent encore à l'activité sur ce substrat. Cet enzyme correspond donc à la première protéase éluée au cours de la chromatographie sur échangeur de cations. Pour la préparation contenant l'enzyme 2 (figure 18 c), nous avons une seule zone d'activité plus déplacée vers la

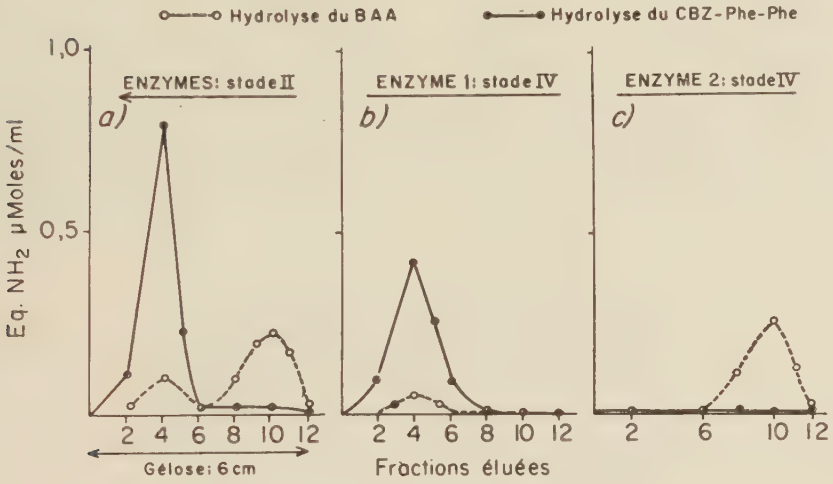


Figure 18.

Caractérisation des protéases par leur action sur des substrats synthétiques, après séparation par électrophorèse sur plaque de gélose :

a) *Préparation partiellement purifiée, Stade II* (*cf. Fig.* 16 b),

b) *et* c) *Enzymes purifiés* 1 *et* 2 *au Stade IV* (*cf. Fig.* 17 b *et* c). *Chaque plaque de gélose est découpée en fractions de* 0,5 *cm de largeur. Après élution, l'hydrolyse des substrats synthétiques par les différentes fractions est estimée par le dosage des groupements* NH_2 *libérés. Les résultats sont exprimés en équivalents* NH_2 *:* µ*Moles/ml.*

cathode et concernant uniquement le BAA. Cette dernière zone d'activité correspond à la deuxième protéase éluée au cours de la chromatographie sur CM-cellulose.

Par ces expériences d'activité sur différents substrats, nous avons pu confirmer les résultats précédemment obtenus en ce qui concerne la séparation des protéases par électrophorèse et cela constitue un critère de pureté supplémentaire.

3. — Propriétés immunochimiques

Les différentes techniques utilisées pour cette étude ont été décrites dans le chapitre précédent. Nous définirons dans ce paragraphe la manière dont nous les avons utilisées pour caractériser les enzymes au cours de leur purification.

a) *Analyses en milieu gélifié Ouchterlony*

La précipitation entre l'immunsérum et les différentes préparations enzymatiques en cours de purification a été suivie selon la technique d'Ouchterlony en milieu gélifié (131). Après 3 à 4 jours, les premières lignes de précipitation apparaissent. Dans la figure 19 nous avons réuni les résultats obtenus après avoir laissé les boîtes pendant 8 jours à 4°. Nous remarquons les faits suivants :

1°) Les préparations contenant les deux enzymes (stade II) réagissent avec l'immunsérum correspondant (figure 19 a) en donnant deux lignes de précipitation, ce qui indique la présence d'au moins deux systèmes de précipitation différents (89).

2°) Les préparations contenant un seul des enzymes après purification donnent une seule ligne de précipitation : fractions 20 et 21 d'une part, 24 et 26 d'autre part (figure 19 b), fractions 20 et 21, 24, 26 et 28 (figure 19 c), ce qui semble indiquer la présence d'un seul antigène dans chacune de ces différentes fractions.

Nous devons cependant donner quelques précisions en ce qui concerne l'emplacement des lignes de précipitation sur ces deux clichés. Nous remarquons en effet que dans ces deux expériences, réalisées avec les mêmes préparations d'antigène mais avec des antisérums différents, l'emplacement des lignes de précipitation correspondant à un antigène donné n'est pas la même dans les deux cas (figure 19 b et 19 c). Les deux antisérums considérés ne semblent pas réagir de la même manière avec les différents antigènes, le sérum 12 (figure 19 b) réagissant préférentiellement avec les fractions 20 et 21 (enzyme 1), alors que le sérum 9 (figure 9 c) donne des lignes de précipitation plus nettes avec les fractions 24, 26 et 28 (enzyme 2), ce qui traduit des différences entre les deux sérums en ce qui concerne le taux des anticorps formés vis-à-vis des antigènes considérés.

L'inversion de l'emplacement respectif des lignes de précipitation peut alors s'expliquer par des différences dans les proportions relatives d'antigène et d'anticorps. Nous savons en effet, d'après Korngold (92) que la migration des lignes de précipitation dépend des proportions relatives d'antigène et d'anticorps.

Enfin, sur la figure 19 c nous observons un dédoublement de la ligne de précipitation correspondant à la fraction 20, alors que cette même fraction donne une seule ligne de précipitation avec un autre antisérum (19 b). Il semble que nous ayons dans le premier cas un artefact occasionné par une variation de température (132).

[a]

[b]

[c]

Figure 19.

Analyse immunochimique en milieu gélifié Ouchterlony des préparations. enzymatiques de Pieris à différentes étapes de la purification.

a) *Réaction de différentes fractions* (65, 75, 80, 90) *d'une préparation partiellement purifiée* (*Stade II*) *avec le sérum anti-enzymes.* (*S : réservoir central*).

b) *Réaction des différentes fractions correspondant aux enzymes purifiés* (*Stade IV*) *avec l'antisérum N°* 12 *:* (*réservoir central*). *Fractions* 20 *et* 21 *: enzyme* 1. *Fractions* 24, 26 *et* 28 *: enzyme* 2.

c) *Réaction de différentes fractions correspondant aux enzymes purifiés* (*Stade IV*) *avec l'antisérum N°* 9 *:* (*réservoir central*) *Fractions* 20 *et* 21 *: enzyme* 1. *Fractions* 24, 26 *et* 28 *: enzyme* 2.

Ce dédoublement s'est en effet produit lorsque les boîtes sont passées de 4° à la température du laboratoire.

3°) Les deux systèmes de précipitation correspondant à chacun de ces enzymes semblent être différents. En effet, nous observons sur le cliché 19 c, que les lignes de précipitation correspondant aux fractions 21 et 24 (enzymes 1 et 2 respectivement) se croisent à leur intersection (formation d'une « éperon » en terme d'immunochimie).

b) *Immunoélectrophorèse*

Ces réactions de précipitation en milieu gélifié peuvent être réalisées sur plaque de gélose après migration des antigènes par électrophorèse.

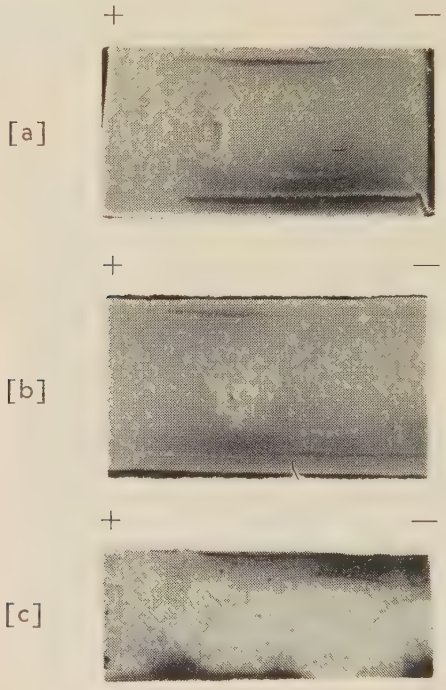


Figure 20.

Immunoélectrophorèses réalisées avec des préparations enzymatiques de Pieris à différentes étapes de la purification.

a) *Réaction d'une préparation partiellement purifiée (Stade II) avec l'immunsérum, après migration des antigènes dans le gélose.*

b) *Ligne de précipitation donnée par l'enzyme* 1.

c) *Ligne de précipitation donnée par l'enzyme* 2.

La précipitation spécifique se faisant au niveau de l'antigène homologue, on peut ainsi reconnaître et localiser chacun des complexes antigène-anticorps.

L'électrophorèse a été exécutée dans les conditions précisées ci-dessus. Le sérum est déposé dans des gouttières le long des plaques. Les lignes de précipitation apparaissent au bout de 5 à 6 jours à 4°.

Avec une préparation contenant les deux enzymes, nous observons (figure 20 a) 2 lignes de précipitation qui se croisent ; l'une commence à l'origine et se prolonge jusqu'à l'extrémité de la plaque, l'autre est plus courte et mieux localisée. Cette dernière correspond à l'enzyme 1 et la ligne précédente au deuxième enzyme plus basique qui a tendance à trainer depuis l'origine. Face à la deuxième gouttière, on ne voit qu'une ligne de précipitation. Ce sérum réagit plus faiblement et, de préférence, avec l'un des enzymes.

En fin de purification, chacune des préparations est soumise à la même expérience. Nous voyons très nettement (20 b et 20 c) que nous obtenons une seule ligne de précipitation et qu'à chaque enzyme correspond une ligne de précipitation différente.

Tous ces résultats obtenus par l'étude immunochimique permettent de tirer deux conclusions : 1° les deux enzymes considérés possèdent des propriétés antigéniques différentes ; 2° chacune des préparations enzymatiques ne semble pas contaminée par des protéines étrangères, et nous avons là un nouveau critère de pureté.

En conclusion : nous avons réalisé la purification de deux protéases dans le chyle de *Pieris brassicae*. Ces deux enzymes ont été obtenus à l'état pur ; ils ont des propriétés chimiques extrêmement voisines, mais peuvent être différenciés par leurs propriétés électrophorétiques et immunochimiques et par leur action sur des substrats synthétiques correspondant à des spécificités différentes.

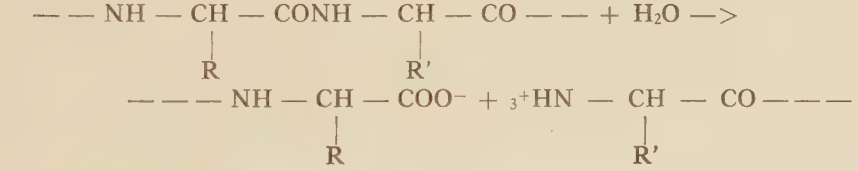
CHAPITRE III

SPÉCIFICITÉ DES PROTÉASES DE PIERIS

Nous avons étudié les principales propriétés des protéases que nous avons pu isoler du chyle de *Pieris brassicae*. Il est nécessaire maintenant de définir leur spécificité qui va nous permettre en même temps de les différencier.

Avant d'aborder cette étude, nous rappellerons brièvement la classification des enzymes protéolytiques d'après leur mode d'action sur les protéines, puis la spécificité des protéases les plus connues.

La réaction catalysée par les enzymes protéolytiques est par définition même l'hydrolyse des liaisons peptidiques dans les protéines :



Cette réaction d'hydrolyse a pu être mise en évidence et étudiée par l'utilisation de peptides synthétiques et de leurs dérivés (16). Les mêmes enzymes peuvent aussi catalyser des réactions de transpeptidation (56) et l'hydrolyse des amides dérivés des acides aminés (activité amidasique). Enfin, la plupart des protéases possèdent une activité estérasique, c'est-à-dire catalysent la réaction d'hydrolyse des esters dérivés des acides aminés (129). Ainsi la chymotrypsine catalyse la réaction (43) :

Acetyl-L-tyrosine éthyl ester + H_2O —> Acetyl-L-tyrosine + Ethanol

Les substrats naturels des enzymes protéolytiques sont des protéines ou des peptides dans lesquels les acides aminés appartiennent à la série L. Selon leur action sur les différents substrats, il est généralement admis de classer ces enzymes en deux catégories (classification suggérée par Bergman en 1942) (17) : les exopeptidases et les endopeptidases.

Les exopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques adjacentes aux groupes : α carboxy-terminal ou α amino-terminal. Les

aminopeptidases, carboxypeptidases et dipeptidases rentrent dans ce groupe.

Les endopeptidases attaquent les liaisons peptidiques aussi bien en milieu de chaîne, qu'en position terminale. Les protéases gastrointestinales (trypsine, chymotrypsine, pepsine), les protéases des plantes, les cathepsines et de nombreux autres appartiennent à cette catégorie. Nous y classerons aussi les protéases d'insectes que nous étudions ici.

En ce qui concerne le mode d'action des différentes protéases, Smith en 1960 propose trois types différents (158) d'après la nature de leur site actif :

— Pour plusieurs enzymes l'action enzymatique dépend de la présence de groupements -SH qui peuvent être inactivés par les métaux lourds ou différents inhibiteurs de groupes -SH. La papaïne et les enzymes de plantes, certaines cathepsines appartiennent à ce type.

— Pour un second groupe, l'activité dépend de la présence de métaux : Mg^{++}, Mn^{++}, Co^{++}, Zn^{++}, liés de façon plus ou moins étroite à l'enzyme. Dans cette catégorie se rangent les carboxypeptidases et la plupart des exopeptidases. Ces enzymes sont fortement inhibés par les agents complexants des ions métalliques.

— Dans une troisième catégorie, on trouve les enzymes qui ne sont pas inhibés par les réactifs des thiols mais sont inhibés par le diisopropylfluorophosphate et autres dérivés organophosphorés. Trypsine, chymotrypsine, subtilisine appartiennent à cette catégorie dans laquelle nous rangerons aussi les protéases de *Pieris*.

Tous ces enzymes attaquent les liaisons peptidiques et leur spécificité est en général assez large par rapport aux autres catégories d'enzymes. Dans le cas des endopeptidases la spécificité concerne généralement la partie du substrat portant le groupement carboxylique de la liaison peptidique et est indépendante de la longueur de la chaîne. En effet, depuis Bergman (18) l'utilisation des dérivés carbobenzoxy des peptides et acides aminés a montré que les protéases peuvent agir sur des substrats relativement courts (19).

De ce fait, la spécifité des enzymes protéolytiques les plus connus a pu être déterminée grâce à l'emploi des substrats synthétiques : amides et dérivés substitués des peptides. Nous donnons dans le tableau IX la nature des coupures réalisées par diverses protéases les plus utilisées pour les études de structure.

Les protéases peuvent donc se répartir en différents groupes selon la nature des liaisons hydrolysées, aliphatiques, aromatiques, basiques ou acides. La spécificité de ces divers enzymes est plus ou moins étroite. Nous verrons que les protéases de *Pieris* peuvent être rapprochées de l'un ou de l'autre de ces groupes.

Tableau IX

Spécificité des différentes protéases

	Origine	Liaisons rompues Bas.	Ac.	Ali.	Arom.	Références
Trypsine	Pancréas	+				(140) (151)
Chymotrypsine .	Pancréas				+	(80) (156)
Pepsine	Estomac		+	+	+	(152)
Parapepsine ..	Estomac			+	+	(148)
Papaïne	Latex	+	+	+	+	(91) (48)
Subtilisine	*B. subtilis*	+	+	+	+	(175) (118) (144)

L'étude de la spécificité des protéases de *Pieris brassicae*, qui est l'objet de ce chapitre, a pu être réalisée en utilisant comme substrats des substrats synthétiques simples des enzymes précédemment cités et des protéines ou polypeptides naturels de structure connue : insuline et glucagon.

A. — HYDROLYSE DES SUBSTRATS SYNTHÉTIQUES

Les substrats que nous avons utilisés pour l'étude de la spécificité sont : soit des amides, soit des dipeptides substitués, soit des di- ou tripeptides non substitués. Dans tous les cas envisagés, la mesure de l'hydrolyse enzymatique consiste à doser le nombre de groupements NH_2 libérés par la rupture de la liaison amide ou de la liaison peptidique ; la technique utilisée a été décrite dans le chapitre I.

1. — Expériences préliminaires

Nous avons tout d'abord envisagé l'action d'une préparation enzymatique partiellement purifiée (Stade II), puis de chacun des enzymes sur un grand nombre de substrats, afin de déterminer la nature des liaisons rompues par ces protéases.

a) Conditions d'hydrolyse

Il s'agit dans ce cas d'une analyse semi-quantitative, en effet, pour ces expériences qui précèdent les mesures de cinétique, nous avons utilisé des quantités importantes d'enzyme (de l'ordre de 50 µg/ml) de manière à obtenir une hydrolyse maximum permettant de définir quels sont les substrats hydrolysés, même lorsque la réaction est faible.

Les substrats sont utilisés à la concentration finale de $2{,}5.10^{-3}$ M, en milieu tamponné de pH 10,5, et la réaction est

effectuée à 35° pendant 30 minutes. Les résultats sont exprimés en équivalents NH_2 (µMoles/ml) libérés après 30 minutes d'hydrolyse.

b) **Résultats**

Les résultats sont rassemblés dans le tableau X et nous pouvons en tirer les conclusions suivantes :

1° La préparation stade II (contenant les deux protéases) hydrolyse le BAA et plus faiblement le di-CBZ-lysine amide, les amides ou dipeptides substitués dérivés des acides aminés aromatiques, de la leucine et de l'alanine. Les di- et tripeptides non substitués ne sont pas hydrolysés (ou très faiblement : dipeptide leucyl-leucine), ce qui semble exclure la présence de dipeptidases dans cette préparation.

Tableau X

Action des deux enzymes sur différents substrats synthétiques

Substrats : $2{,}5.10^{-3}$ M	Equivalents NH_2 en µM/ml		
	Préparation : Stade II	Enzyme 1	Enzyme 2
Benzoyl-Arginine amide	1,8	0	1,9
di-CBZ-Lysine amide	0,1	0	0,07
Acétyl-Tyrosine amide	0,3	0,18	0
Phénylalanine amide	0,67	0,46	0
CBZ-Phénylalanyl-Phénylalanine	1,25	1,26	0
CBZ-Phénylalanyl-Leucine	1,9	2,01	0
CBZ-Tryptophyl-Tyrosine	1,4	1,5	0
CBZ-Leucyl-Phénylalanine	1,23	1,02	0,17
CBZ-Alanyl-Leucine	1,92	1,85	0,1
CBZ-Glycyl-Phénylalanine	0,16	0,29	0
CBZ-Glutamyl-Tyrosine	0,04	0,04	0
Leucyl-Leucine	0,1	0	0,12
Glycyl-Tyrosine	0	0	0
Glycyl-Proline	0	0	0
Alanyl-Glycyl-Glycine	0	0	0,03
Glycyl-Glycine	0	0	0

Les résultats sont exprimés en Equivalents NH_2 libérés dans le milieu de réaction : µMoles/ml.

2° L'enzyme 1 est spécifique des liaisons aromatiques, de la leucine et de l'alanine, l'hydrolyse des dipeptides substitués étant plus importante que celle des amides. En ce qui concerne les acides aminés aromatiques, il est difficile de préciser si l'hydrolyse se fait au niveau du carboxyle ou du radical NH_2 des acides aminés

considérés. Cependant, l'hydrolyse très faible du substrat CBZ-glycyl-phenylalaline semble indiquer que la coupure se fait préférentiellement au niveau du carboxyle.

3° L'enzyme 2 hydrolyse principalement le BAA et plus faiblement les substrats : CBZ-Leu-Phe et CBZ-Ala-Leu. Cet enzyme est donc plus spécifique des liaisons basiques.

Ces différents résultats, qui sont obtenus aussi bien à pH 9,5 qu'à pH 10,5, montrent que la spécificité globale manifestée par la préparation au stade II résulte de l'action simultanée des deux protéases dont la spécifité est nettement différente.

Nous avons déjà montré, au cours de l'étude des propriétés de ces enzymes, comment l'action de différentes fractions enzymatiques en cours de purification, sur les deux types de substrats : CBZ-Phe-Phe et BAA, permettait la différenciation des protéases et laissait entrevoir deux types de spécificité. Le stade terminal de la purification permet alors de dissocier totalement les manifestations correspondant à ces deux types de spécifité et de les attribuer à deux enzymes différents.

Il s'agit, en ce qui concerne l'enzyme 1, d'une activité type chymotrypsine, comportant de plus l'hydrolyse des liaisons leucine et alanine. L'enzyme 2 répond à une activité type trypsine et manifeste une sensibilité non négligeable aux liaisons leucine et alanine.

2. — Cinétique d'hydrolyse de différents substrats par chacune des protéases

Ayant ainsi caractérisé les deux protéases par leur spécificité, il était nécessaire d'étudier quantitativement leur action sur leurs substrats respectifs.

Nous avons suivi la vitesse d'hydrolyse du CBZ-Phe-Phe par l'enzyme 1 et du BAA par l'enzyme 2, en fonction du temps, de la concentration en enzyme et de la concentration en substrat, et déterminé les constantes cinétiques caractéristiques de chacune de ces réactions d'hydrolyse. Puis nous avons comparé la vitesse d'hydrolyse de différents substrats de ce type, par chacun des enzymes de *Pieris* et par les protéases de spécificité voisine : trypsine et chymotrypsine.

a) Hydrolyse du CBZ-Phe-Phe par l'enzyme 1

Dans une série de dosages, nous avons incubé le substrat à la concentration $2{,}5.10^{-3}$ M utilisée pour les expériences précédentes, en présence de plusieurs concentrations d'enzyme (comprises entre 3 et 15 µg/ml), dans un volume final de 1 ml, en milieu tamponné de pH 10,5 et à 35°. La durée totale de l'expérience est de 1 heure. Des prélèvements de 0,1 ml sont effectués après 10, 20, 30 et 60 minutes, pour chaque concentration d'enzyme ; les dosages sont effectués sur ces prélèvements.

Nous remarquons (figure 21) que l'hydrolyse du substrat est proportionnelle à la concentration en enzyme, dans les limites envisagées ci-dessus et que la réaction est linéaire en fonction du temps pendant les 20 premières minutes (figure 22).

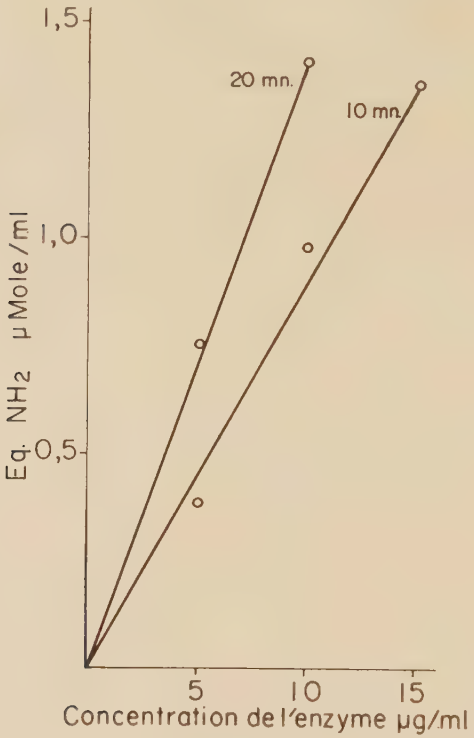


Figure 21.

Hydrolyse du substrat : CBZ-Phe-Phe par l'enzyme 1 *en fonction de la concentration de l'enzyme. Concentration du substrat :* $2{,}5.10^{-3}$ *M.*

La vitesse d'hydrolyse, mesurée dans les conditions où la réaction est linéaire, est de **10.10**$^{-3}$ µMoles par minute et par µg d'enzyme.

Par la mesure des vitesses d'hydrolyse en fonction de la concentration en substrat, nous avons déterminé la constante de Henri et Michaelis correspondant à cette réaction. Les concentrations en substrat envisagées sont comprises entre 0,5 et 5.10^{-3} M. L'expression des résultats selon Lineweaver et Burk (106) permet de calculer la constante de Michaelis (figure 23). Nous observons la

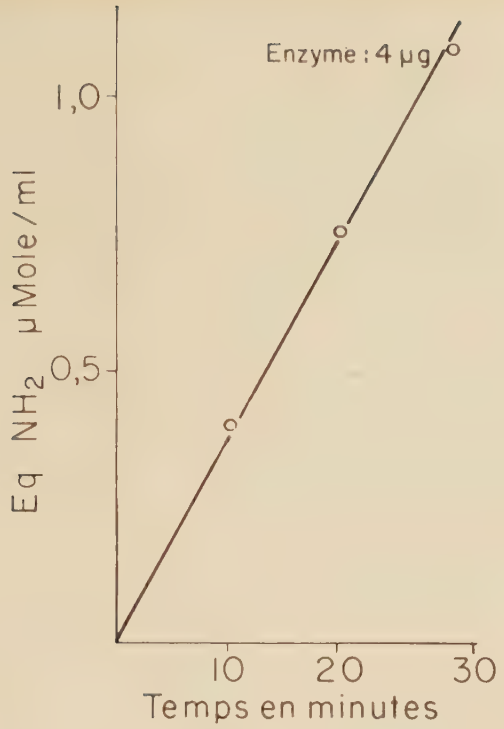


Figure 22.

Hydrolyse du substrat : CBZ-Phe-Phe par l'enzyme 1 *en fonction du temps.*
Concentration du substrat : 2,5.10^{-3} *M.*

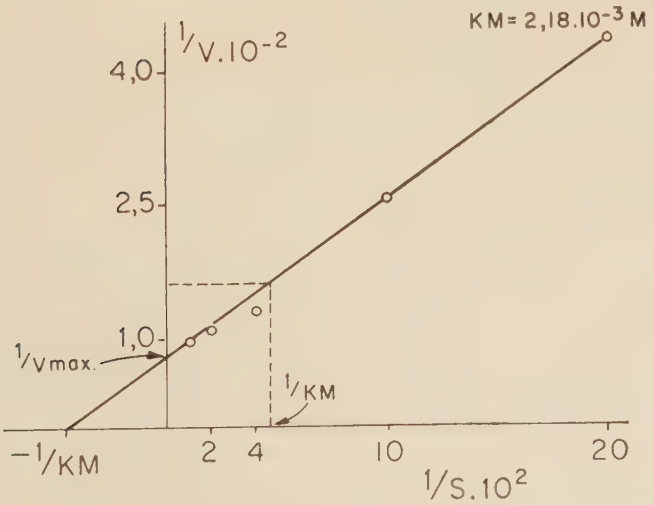


Figure 23.

Constante de Michaelis de la réaction d'hydrolyse du substrat : CBZ-Phe-Phe par l'enzyme 1.
V : vitesse d'hydrolyse évaluée en µMoles de substrat hydrolysé par µg d'enzyme et par minute.
S : concentration du substrat.

valeur suivante : $KM = \mathbf{2{,}18.10^{-3}}$ M. Les valeurs de la constante de Michaelis, trouvées dans la littérature, en ce qui concerne l'hydrolyse de différents substrats par la chymotrypsine, sont généralement comprises entre 5.10^{-3} M et 5.10^{-2} M (80) (81) (173) (90).

b) **Hydrolyse du BAA par l'enzyme 2**

Nour avons suivi dans les mêmes conditions, pH 10,5 et 35°, l'hydrolyse du BAA par l'enzyme 2. Les concentrations d'enzyme utilisées sont comprises entre 5 et 20 µg/ml, et le dosage des groupement NH_2 libérés est effectué après 10, 20, 40 et 60 minutes d'hydrolyse, pour chaque concentration d'enzyme.

L'hydrolyse est proportionnelle aux concentrations d'enzyme et la réaction est linéaire dans les limites indiquées ci-dessus (figure 24). En ce qui concerne l'hydrolyse en fonction du temps, nous

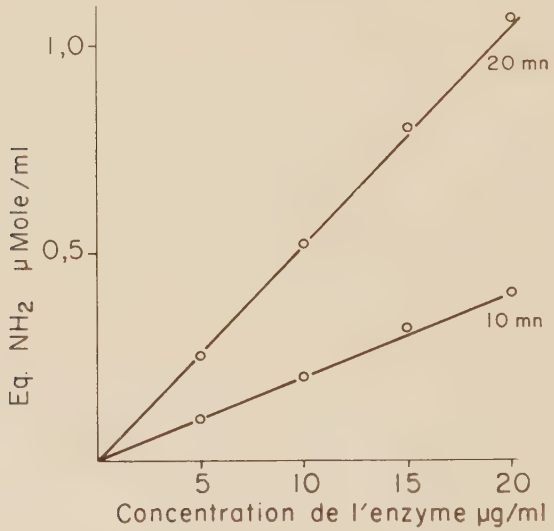


Figure 24.

Hydrolyse du substrat : BAA par l'enzyme 2, en fonction de la concentration de l'enzyme. Concentration du substrat : $2{,}5.10^{-3}$ *M.*

remarquons (figure 25) que la réaction, linéaire dans les 20 premières minutes, n'évolue plus au-delà de ce temps. A la partie linéaire de la courbe succède un palier correspondant à des vitesses d'hydrolyse différentes pour les concentrations d'enzyme envisagées. Ces résultats peuvent s'expliquer, ou par une désactivation de l'enzyme en cours d'hydrolyse, ou plutôt par une inhibition due aux produits de la réaction. Nous savons en effet que l'hydrolyse

du BAA par la trypsine est inhibée par la benzoyl arginine, analogue structural du substrat (66), de même l'hydrolyse de l'acétyl-phenyl-alanyl-tyrosine par la chymotrypsine est inhibée par l'acétyl-phényl-alanine (69). Il semble donc que des phénomènes de cet ordre : inhibition par le produit de la réaction, en l'occurrence la benzoyl-arginine, interviennent dans l'hydrolyse du BAA par l'enzyme de *Pieris*.

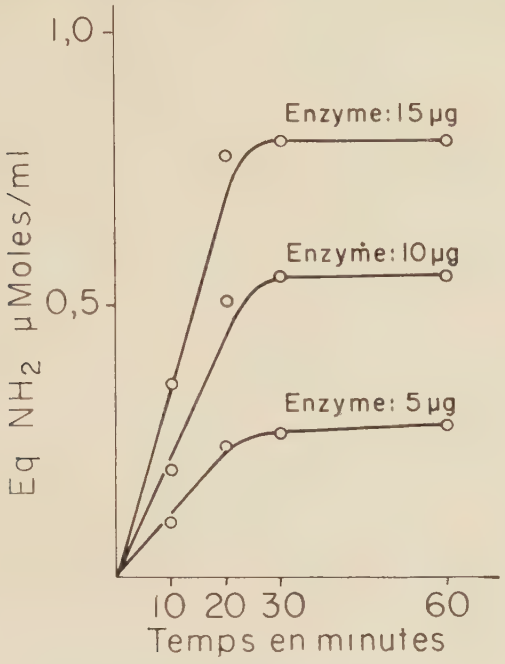


Figure 25.

Hydrolyse du substrat BAA par l'enzyme 2 en fonction du temps. Concentration du substrat : $2{,}5.10^{-3}$ *M.*

La vitesse de l'hydrolyse de ce substrat, mesurée dans les conditions où la réaction est linéaire, est : $\mathbf{2{,}5.10^{-3}}$ µMoles par minute et par µg d'enzyme.

La constante de Michaelis du système a été déterminée comme précédemment, pour des concentrations de substrat comprises entre 0,5 et 5.10^{-3} M (figure 26), ce qui nous donne la valeur suivante : $KM = \mathbf{1{,}5.10^{-3}}$ M. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle de la réaction d'hydrolyse du BAA par la trypsine, dont la constante $KM = \mathbf{2{,}1.10^{-3}}$ **M** (77). Par contre l'affinité de la papaïne pour ce substrat est moindre, puisque la valeur du KM dans ce cas atteint $\mathbf{4.10^{-2}}$ M (168).

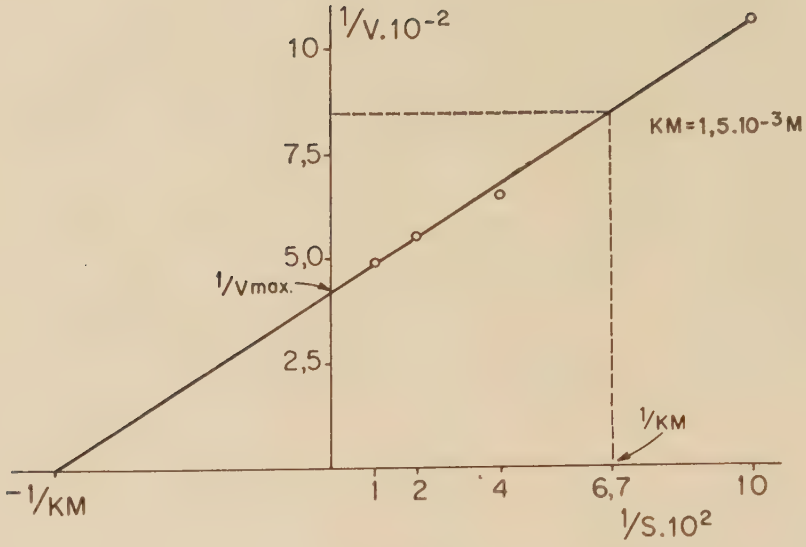


Figure 26.

Constante de Michaelis de la réaction d'hydrolyse du substrat : BAA par l'enzyme 2.
V : Vitesse d'hydrolyse calculée en µMoles de substrat hydrolysé par minute et par µg d'enzyme.
S : Concentration du substrat.

c) **Vitesse d'hydrolyse de différents substrats par chacune des protéases**

Nous avons réuni dans le tableau XI les vitesses d'hydrolyse de différents substrats répondant à la spécificité des enzymes, dans les conditions précisées ci-dessus.

Tableau XI

Vitesse d'hydrolyse de différents substrats par chacun des enzymes

Substrats 2,5.10⁻³ M	*Pieris* Enzyme 1	*Pieris* Enzyme 2	Trypsine	Chymo-trypsine
BAA	0	2,7	0,26	0
CBZ-Phe-Phe	10	0	0	0
CBZ-Phe-Leu	5,2	0	0	0,8
CBZ-Try-Tyr	4,5	0	0	0,3
CBZ-Leu-Phe	4,5	0,48	0	0
CBZ-Ala-Leu	2,6	0,4	0	0

Les résultats sont exprimés en µMoles de substrat hydrolysées/par minute par µg d'enzyme × 10^3, à 35°.

Pour comparer l'action des enzymes de *Pieris* avec d'autres enzymes de spécificité connue, nous avons déterminé la vitesse d'hydrolyse de ces différents substrats par la trypsine et la chymotrypsine à leur pH optimum, c'est-à-dire 8,0. Ce tableau suggère les commentaires suivants :

1° seul l'enzyme 2 de *Pieris* est actif sur BAA.

2° l'enzyme 1 hydrolyse les substrats aromatiques.

3° les substrats dérivés de la leucine ou de l'alanine sont hydrolysés par les 2 enzymes, très fortement hydrolysés par l'enzyme spécifique des substrats aromatiqués et avec une vitesse non négligeable par l'enzyme 2.

4° la vitesse d'hydrolyse du BAA par la trypsine est 10 fois moindre que par l'enzyme de *Pieris*.

5° la chymotrypsine n'est pas active sur le substrat le plus hydrolysé par l'enzyme 1 : CBZ-Phe-Phe, et elle est 8 à 10 fois moins active que cet enzyme sur les 2 autres substrats aromatiques. A ce propos, il convient de signaler que les substrats généralement utilisés pour l'étude de la spécificité de la chymotrypsine sont des amides substituées (90) et plus rarement des dipeptides substitués du type de ceux que nous avons envisagés.

Dans les conditions de l'expérience, c'est-à-dire pour des concentrations en substrat $2{,}5.10^{-3}$ M et au pH optimum des différents enzymes, nous pouvons dire que les enzymes de *Pieris* hydrolysent les substrats envisagés avec une vitesse très supérieure à celle des enzymes de spécificité voisine, trypsine et chymotrypsine.

Enfin, le spectre d'action de ces protéases semble être plus étendu que celui des enzymes précédemment cités. Alors que la spécificité de la trypsine est strictement limitée aux liaisons basiques : arginine et lysine, l'enzyme 2 de *Pietris* hydrolyse de façon appréciable les substrats dérivés de la leucine et de l'alanine. L'enzyme 1 de *Pieris*, comparable à la chymotrypsine, en diffère cependant par la propriété d'hydrolyser certaines liaisons aliphatiques (leucine et alanine) avec une vitesse du même ordre que les liaisons mettant en jeu des acides aminés aromatiques. En effet, la spécificité de la chymotrpysine concerne principalement les acides aminés aromatiques (61) (110), bien que l'hydrolyse lente de certains dérivés de la leucine (62) ou de la méthionine (90) ait été signalée.

3. — **Activité estérasique**

Enfin, nous avons examiné l'action de ces enzymes, qui sont des enzymes inhibés par le DFP, sur les esters.

L'hydrolyse des esters : TAME (Tosyl-arginine-methyl-ester) et ATEE (Acetyl-tyrosine-ethyl-ester) par les enzymes respectivement 2 et 1 a été suivie en utilisant la technique potentiométrique de Schwert décrite au chapitre I.

Les substrats sont utilisés à la concentration $2{,}5.10^{-3}$ et l'hydrolyse est suivie à 25° en cellule thermostatée.

Les résultats sont exposés dans le tableau XII où nous trouvons aussi l'action de la chymotrypsine sur ATEE.

Tableau XII

Activité estérasique des enzymes de Pieris

Subtrats : Concentration 2,5.10 – 3 M	Enzymes	Vitesse d'hydrolyse
Tosyl Arginine Méthyl Ester	*Pieris* 2	0,029
Acétyl Tyrosine	*Pieris* 1	0,010
Ethyl Ester	Chymotrypsine	0,2

Les résultats sont exprimés en μMoles de substrat hydrolysées par minute et par μg d'enzyme.

Le TAME est très rapidement hydrolysé par l'enzyme 2. Par contre l'ATEE est hydrolysé par l'enzyme 1 à une vitesse 20 fois inférieure à celle de la chymotrypsine. Les dérivés de la tyrosine, ester ou amide, semblent être moins rapidement hydrolysés par l'enzyme 1 que les dérivés de la phénylalanine. Nous observons le phénomène inverse dans le cas de la chymotrypsine.

Malgré ces différences, on peut dire que ces enzymes présentent l'activité estérasique vis-à-vis des substrats correspondant à leur spécificité.

B. — ACTION DES PROTÉASES SUR DES POLYPEPTIDES DE STRUCTURE CONNUE

Par l'emploi des substrats synthétiques, nous avons pu définir la spécificité de chacune des protéases. Il nous a semblé nécessaire de compléter cette étude par l'analyse de leur action sur des polypeptides naturels de structure connue : le glucagon et l'insuline. Pour ce faire, nous avons étudié l'hydrolyse de ces substrats par chacun des enzymes, avec l'intention de mettre en évidence les particularités de leur action et d'appliquer à une chaîne peptidique (possédant tous les acides aminés des protéines) les notions déjà acquises sur leur spécificité.

Nous exposerons tout d'abord l'hydrolyse du glucagon dont l'interprétation est facilitée par le fait que ce substrat est constitué d'une seule chaîne peptidique ne comportant pas de pont disulfure intracaténaire.

1. — Hydrolyse du glucagon

Pour chacune des protéases, nous avons suivi la vitesse d'hydrolyse du peptide en fonction du temps et de la concentration en enzyme, puis nous avons analysé la composition des lysats résultant de la réaction. La concentration du substrat dans le milieu réactionnel est de 5.10^{-4} M, l'hydrolyse est effectuée à 35° en milieu tamponné de pH 9,5, pendant une durée totale de 2 heures 30, et les quantités d'enzyme utilisées sont comprises entre 10 et 60 µg/ml. Des prélèvements, effectués en cours d'hydrolyse permettent de suivre quantitativement la réaction par le dosage des groupements NH_2 résultant de la rupture des liaisons peptidiques.

a) Hydrolyse par l'enzyme 1

La cinétique d'hydrolyse du glucagon par cet enzyme est donnée par la figure 27. Nous constatons que l'hydrolyse atteint rapidement son maximum après 40 minutes d'incubation, et qu'elle est plus importante pour la concentration la plus élevée d'enzyme. Pour cette dernière concentration (60 µg/ml), il semble que toutes les liaisons soient rompues à la même vitesse et que la réaction n'évolue plus au-delà de 40 minutes ; par contre, dans le cas des concentrations les plus faibles d'enzyme, 12 et 24 µg, il semble que la courbe présente deux pentes, la première partie de la courbe correspondrait aux liaisons les plus rapidement hydrolysées (20 premières minutes), alors que pour la deuxième partie de la courbe manifestant une hydrolyse plus lente, il pourrait s'agit de la rupture des liaisons aliphatiques.

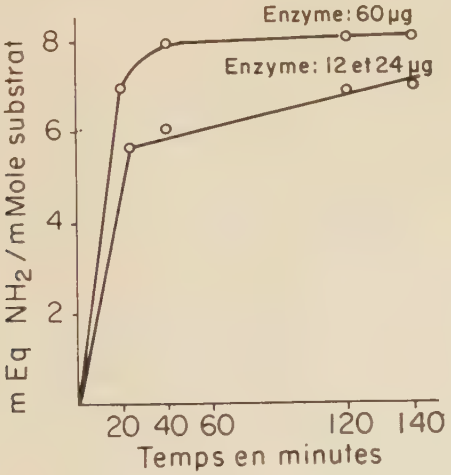


Figure 27.

Cinétique d'hydrolyse du glucagon par l'enzyme 1.

De toute manière, les maxima d'hydrolyse sont du même ordre et atteignent 8 mEq NH_2 par mMole de substrat, ce qui, théoriquement, indique la rupture d'au moins 8 liaisons peptidiques.

Nous avons réalisé l'analyse qualitative de ces lysats au moyen de la technique d'électrochromatographie, non pas dans le but d'isoler et d'analyser chacun des peptides résultant de l'hydrolyse, mais simplement dans l'intention de vérifier que le nombre et la nature des peptides libérés correspondent à la coupure des liaisons prévisibles d'après la spécificité de l'enzyme.

Le chromatogramme résultant de cette analyse (figure 28) révèle la présence de huit taches que nous avons pu, pour la plupart, identifier au moyen de révélations spécifiques de différents acides aminés (cf. chapitre I). Ces données ainsi que le sens de la migration en électrophorèse nous ont permis, connaissant la spécificté de l'enzyme et la structure du peptide, d'interpréter le chromatogramme de la manière qui est proposée dans le tableau XIII.

Les coupures des liaisons théoriquement prévisibles, résultant de la spécificité de l'enzyme, sont les suivantes :

Tyr-Ser libérant le peptide 1 à 9.
Tyr-Leu libérant le peptide 9 à 12.
Leu-Asp libérant la leucine.
Ala-Glu libérant le peptide 13 à 18.
NH_2
Phe-Val libérant le peptide 18 à 21.
Phe-Val libérant le peptide 21 à 25.
Try-Leu libérant le peptide 25 à 28.
Leu-Met libérant le peptide 29 à 31.

soit au total sept peptides et un acide aminé libre, la leucine.

C'est effectivement ce que nous observons à la suite de l'électrochromatographie et l'explication que nous proposons à la suite du schéma rend compte de l'hydrolyse des liaisons peptidiques au niveau du carboxyle des acides aminés aromatiques : tyrosine, phénylalanine, tryptophane, de la leucine et de l'alanine.

b) **Hydrolyse par l'enzyme 2**

Nous avons de la même manière étudié l'hydrolyse du glucagon par l'enzyme 2 actif au niveau du carboxyle de l'arginine, de la leucine et vraisemblablement de l'alanine. En ce qui concerne la spécificité de cet enzyme : l'hydrolyse des substrats que nous avons envisagés précédemment laissait subsister une incertitude au sujet de la lysine. Nous espérions résoudre cette question au moyen de l'hydrolyse du glucagon.

L'analyse quantitative de la réaction d'hydrolyse en fonction du temps montre que le nombre de liaisons rompues est le même,

H-His-Ser-Glu-Gly-Thr-Ser-Asp-Tyr|Ser-Lys-Tyr|Leu|Asp-Ser-Arg-Arg-Ala|Glu-Asp-Phe|Val-Glu-Asp-Phe|Val-Glu-Try|Leu|Met-Asp-Thr-OH

1 2 NH$_2$ 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 NH$_2$ 19 20 21 22 NH$_2$ 23 24 25 26 NH$_2$ 27 28 29 30 NH$_2$ 31

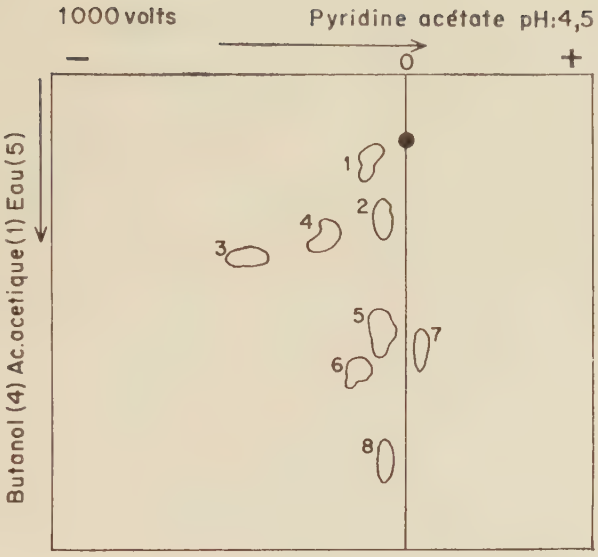


Figure 28.

Séparation par électrochromatographie des produits d'hydrolyse du glucagon par l'enzyme 1.

Tableau XIII

Interprétation de l'hydrolyse du glucagon par l'enzyme 1

Taches	Révélations spécifiques					Nature possible
	Arg	His	Tyr	Met	Try	
1		+	+			Peptide : 1 à 9
2				+		Peptide : 29 à 31
3	+					Peptide : 13 à 18
4			+			Peptide : 9 à 12
5						Peptide : 18 à 21
6					+	Peptide : 25 à 28
7						Peptide : 21 à 25
8						Leucine libre

quelles que soient les concentrations d'enzyme utilisées (figure 29).

Dans les 20 premières minutes, 3 mEq NH_2/mMole de substrat sont libérés, puis la réaction atteint lentement son maximum, soit 5 mEq NH_2, après 2 heures 30 d'hydrolyse. L'allure de la courbe d'hydrolyse semble mettre en évidence deux vitesses d'hydrolyse nettement différentes : toutes les liaisons ne seraient pas rompues à vitesse égale. Nous avons effectivement montré au cours de l'hydrolyse des substrats, que les liaisons arginine étaient plus rapidement hydrolysées par cet enzyme que les liaisons aliphatiques.

La libération de 5 mEquivalents NH_2 par mMole de substrat signifie qu'un minimum de 5 liaisons sont rompues au cours de la réaction d'hydrolyse.

L'analyse d'un tel lysat par électrochromatographie permet de séparer six produits d'hydrolyse (figure 30) que nous avons pu identifier au moyen des réactions caractéristiques de différents acides aminés (tableau XIV). Etant donné la structure du glucagon et la spécificité de cette protéase, les liaisons théoriquement rompues seraient les suivantes :

Lys-Tyr libérant le peptide 1 à 11.
Leu-Asp libérant le peptide 11 à 13.
Arg-Arg libérant le peptide 13 à 16.
Arg-Ala libérant l'arginine.
Ala-Glu libérant l'alanine.

NH_2

Leu-Met libérant les peptides 18 à 29 et 29 à 31.

soit au total cinq peptides et deux acides aminés : arginine et alanine, correspondant à la rupture de six liaisons peptidiques.

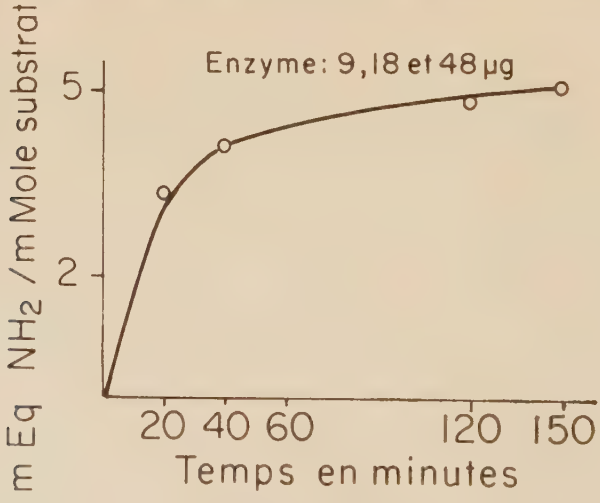


Figure 29.
Cinétique d'hydrolyse du glucagon par l'enzyme 2.

H-His-Ser-Glu-Gly-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys|Tyr-Leu|Asp-Ser-Arg|Arg|Ala-Glu-Asp-Phe-Val-Glu-Asp-Phe-Val-Glu-Try-Leu|Met-Asp-Thr-OH

NH_2 NH_2 NH_2 NH_2 NH_2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31

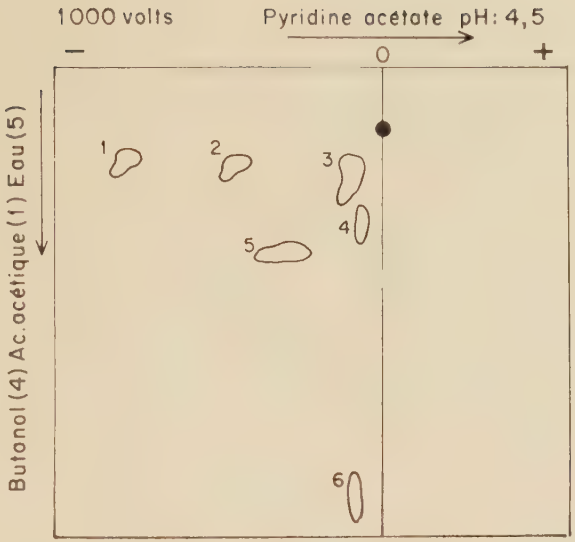


Figure 30.

Séparation par électrochromatographie des produits d'hydrolyse du glucagon par l'enzyme 2.

Tableau XIV

Interprétation de l'hydrolyse du glucagon par l'enzyme 2

Taches	Révélations spécifiques					Nature possible
	Arg	His	Tyr	Met	Try	
1	+					Arginine libre
2	+					Peptide : 13 à 16
3		+	+			Peptide : 1 à 11
4				+		Peptide : 29 à 31
5					+	Peptide : 17 à 29
6			+			Peptide : 11 à 13

Or, la technique d'électrochromatographie sépare six constituants parmi lesquels nous avons pu identifier cinq peptides et l'arginine libre, ce qui semblerait indiquer que la liaison Ala-Glu

NH_2

n'a pas été hydrolysée. En ce qui concerne la lysine, la coupure au niveau de cet acide aminé se trouve démontrée par l'existence de deux peptides à tyrosine, parmi lesquels un dipeptide Tyr-Leu dont le Rf en chromatographie est légèrement supérieur à celui de la leucine.

Par ces différents résultats, nous démontrons que l'enzyme 2 hydrolyse le glucagon au niveau du carboxyle des deux résidus arginine, de la lysine et des deux résidus leucine en réalisant la rupture de cinq liaisons peptidiques. Ce résultat correspond effectivement à la libération de 5 mEq NH_2/mMole de substrat mise en évidence par l'étude cinétique.

La spécificité de cet enzyme vis-à-vis de l'alanine n'est pas expliquée par cette expérience.

2. — Hydrolyse de l'insuline

Ayant confirmé la spécificité des protéases au cours de l'hydrolyse d'un polypeptide linéaire, nous avons cherché à voir si ces données s'appliquaient encore à un substrat plus complexe : l'insuline.

L'hydrolyse de ce substrat nous a semblé d'autant plus intéressante qu'il s'agit d'une molécule formée de deux chaînes peptidiques et présentant trois ponts disulfure. Nous avons entrepris cette étude avec un double objectif : contrôler la spécificité des enzymes au cours de l'hydrolyse d'une protéine et voir si l'action de ces enzymes est possible en présence de liaisons disulfure. L'insuline, en tant que substrat de protéolyse, est généralement utilisée après avoir séparé les deux chaînes peptidiques par oxydation performique ou par réduction (151) (54) (27) (96).

Nous avons envisagé ici l'hydrolyse de l'insuline native par chacune des protéases de *Pieris* et comparé leur action à celle de la trypsine et de la chymotrypsine à leur pH optimum.

Le substrat à la concentration 5.10^{-4} M, en milieu tamponné à pH 9,5, est soumis à l'action de quantités croissantes d'enzyme comprises entre 10 et 100 µg/ml, pendant 2 heures 30 à 35°. Des prélèvements sont effectués en cours d'expérience et la réaction est suivie quantitativement par le dosage des groupements NH_2 libérés. En ce qui concerne la trypsine et la chymotrypsine, l'hydrolyse est réalisée à pH 8,0.

a) Hydrolyse par l'enzyme 1

L'interprétation des courbes de cinétique est évidemment plus complexe que lorsqu'il s'agit d'une seule chaîne peptidique, cepen-

dant, l'examen de la figure 31 suggère les commentaires suivants :

— L'hydrolyse par l'enzyme 1 de *Pieris* est proportionnelle aux concentrations d'enzyme : pour les faibles concentrations, le maximum de 2 m Equivalents NH_2 est atteint après 1 heure, alors que pour les concentrations plus élevées et notamment pour 96 µg, la réaction évolue jusqu'à la libération de 8 m Equivalents NH_2, après 2 heures 30 d'incubation. Etant donné le nombre de liaisons hydrolysées dans ce cas, ce résultat implique des coupures au niveau des acides aminés aromatiques et aliphatiques, non seulement à l'extrémité C terminale de la chaîne B, mais encore à l'intérieur des chaînes peptidiques situées entre les ponts disulfure.

— Par contre, la chymotrypsine libère un maximum de 2 m Equivalents NH_2 pour la concentration la plus élevée d'enzyme et ce maximum est d'emblée atteint après 30 minutes d'hydrolyse, ce qui semblerait vouloir dire que deux liaisons peptidiques seulement sont hydrolysées, quelle que soit la durée de la réaction. Il s'agit vraisemblablement des liaisons Tyr-Thr et Phe-Phe de l'extrémité C terminale de la chaîne B, extérieure aux ponts disulfures.

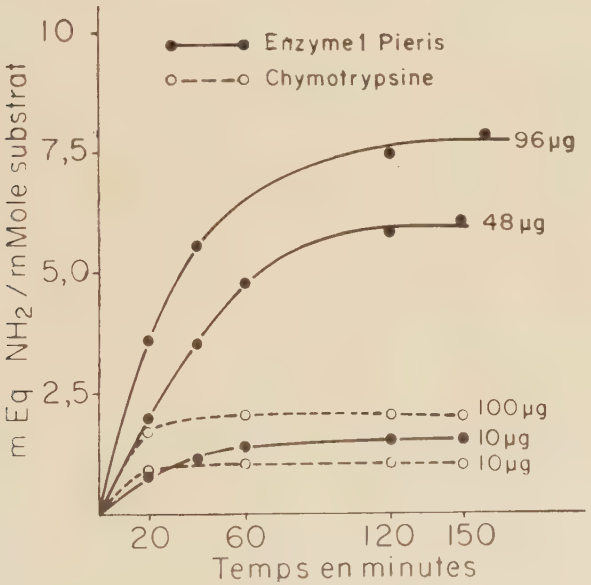


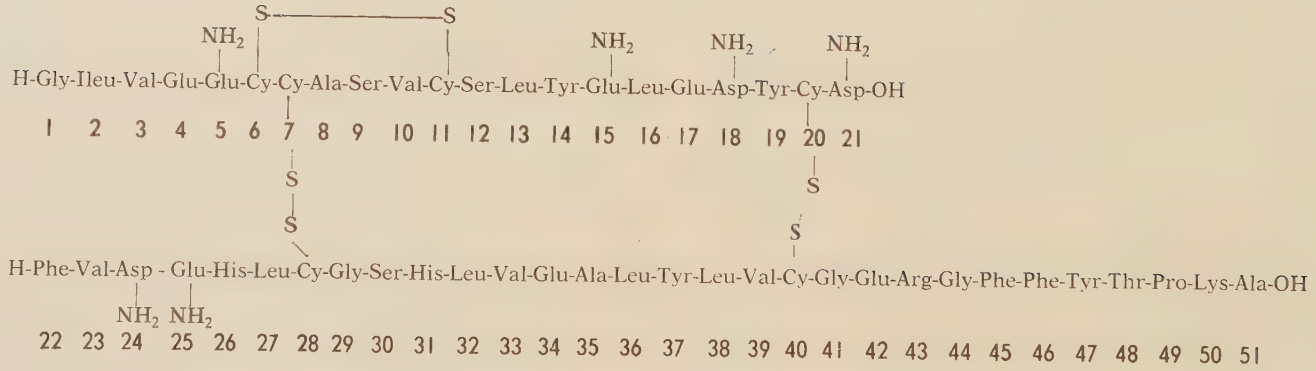
Figure 31.

Cinétique d'hydrolyse de l'insuline native par l'enzyme 1.

Cette étude cinétique met en évidence de façon marquante la différence entre la chymotrypsine et la protéase de *Pieris*, l'efficacité de cet enzyme permettant l'hydrolyse des liaisons peptidi-

Tableau XV

Formule de l'insuline (bœuf) (151)



ques dans la partie de la molécule comprise entre les ponts disulfure (tableau XV).

Nous avons alors cherché à connaître la composition globale des lysats obtenus avec la concentration la plus élevée d'enzyme, en fin de réaction, avec l'intention de vérifier que le nombre de produits libérés correspond au nombre de liaisons peptidiques hydrolysées, soit un minimum de huit liaisons. L'analyse d'un tel lysat, effectuée par électrochromatographie, permet de séparer huit produits d'hydrolyse (figure 32). L'identification

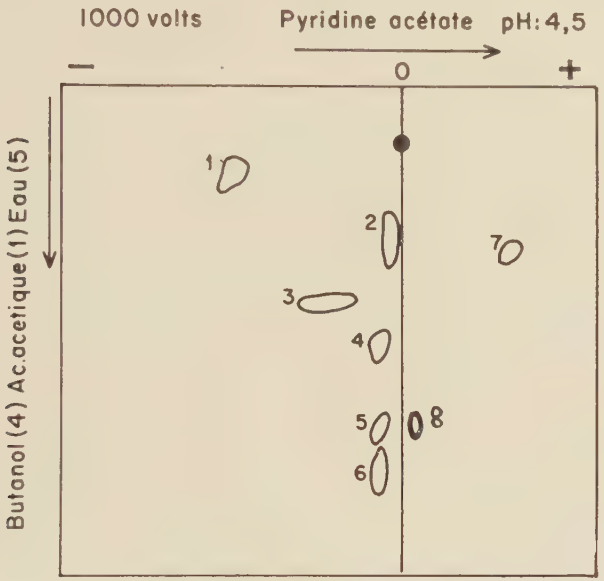


Figure 32.

Séparation par électrochromatographie des produits d'hydrolyse de l'insuline native par l'enzyme 1.

des peptides est évidemment compliquée par la présence des ponts disulfure, cependant, au moyen des réactions spécifiques précédemment citées, il semble que nous ayons pu localiser les peptides et mettre en évidence la présence de plusieurs acides aminés libres : tyrosine, phenylalanine et leucine (tableau XVI). En ce qui concerne ces acides aminés libres, l'identification est complétée par la mesure des Rf et en utilisant le procédé de co-chromatographie. La libération de ces acides aminés et notamment de la leucine implique l'hydrolyse dans la partie centrale de la chaîne B.

Etant donné la spécificité de cet enzyme concernant le car-

Tableau XVI

Interprétation de l'hydrolyse de l'insuline par l'enzyme 1

Taches	Révélations spécifiques					Migration en électrophorèse	Nature possible
	Arg	His	Tyr	Cyss	Pro		
1					+	—	Peptide 48 à 51
2	+		+	+		0	17———21 S S 39———45
3		+		+		—	1———14 S S 22———32
4			+			0	Tyrosine libre
5						0	Phénylalanine
6						0	Leucine
7						+	Peptide 33 à 36
8						+	Peptide 15 à 17

boxyle des acides aminés aromatiques, de la leucine et de l'alanine, les liaisons théoriquement rompues sont les suivantes :

— liaison Leu-Tyr et Leu-Val libérant l'extrémité N terminale
13 14 32 33
de la molécule.

— liaison Tyr-Glu-NH_2 libérant la tyrosine.
14 15

— liaison Leu-Glu libérant le peptide 15 à 17.
19 20

— liaison Leu-Glu libérant le peptide 17 à 20.
16 17

— liaison Ala-Leu libérant le peptide 33 à 36.
35 36

— liaison Leu-Tyr libérant la leucine.
36 37

— liaison Tyr-Leu libérant la tyrosine.
37 38

— liaison Leu-Val libérant la leucine.
38 39

— liaison Phe-Phe libérant le peptide 39 à 46 relié à l'extré-
45 46
mité C terminale de la chaîne A.
— liaison Phe-Tyr libérant la phénylalaline.
46 47
— liaison Tyr-Thr libérant la tyrosine et la partie C termi-
47 48
nale de la chaîne B.
— liaison Phe-Val libérant la phénylalanine.
22 23

soit au total neuf fragments dont six peptides et trois acides aminés libres : leucine, tyrosine et phénylalanine.

Or nous trouvons sur le chromatogramme huit taches, parmi lesquelles les trois acides aminés envisagés et cinq peptides, ce qui indique que toutes les liaisons théoriquement sensibles à l'enzyme ont été rompues, à l'exception d'une seule. Il pourrait s'agir de la liaison Tyr-Cy voisine du pont disulfure de l'extrémité C terminale, en effet, la tache 2 positive au réactif de l'arginine et des acides aminés soufrés est encore positive au réactif de la tirosine. Ces différents résultats confirment ce que suggérait l'examen des courbes de cinétique, à savoir l'efficacité de cet enzyme en présence de liaisons disulfure alors que la chymotrypsine hydrolyse seulement la partie C terminale de la chaîne B.

b) Hydrolyse par l'enzyme 2

Dans le cas de cette protéase, nous observons encore l'hydrolyse de l'insuline native, hydrolyse très supérieure à celle qui est manifestée par la trypsine (figure 33). Nous remarquons :

1° que la vitesse d'hydrolyse est proportionnelle aux quantités d'enzyme utilisées et à la durée de la réaction.

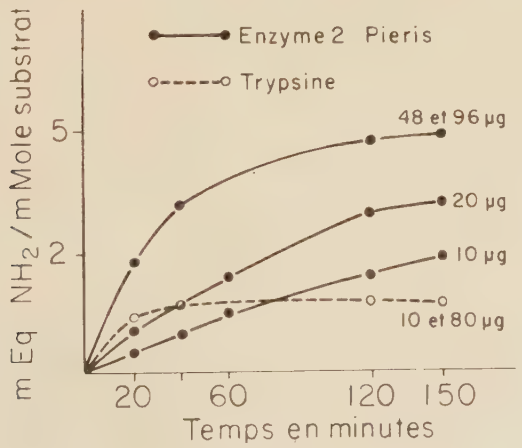


Figure 33.

Cinétique d'hydrolyse de l'insuline native par l'enzyme 2.

2° que le maximum de 5 mEq NH_2 par mMole de substrat est atteint seulement avec les deux concentrations les plus élevées d'enzyme.

3° que pour la trypsine, l'hydrolyse est maximum après les 40 premières minutes de la réaction ; le maximum de 1,5 mEq NH_2 est atteint, quelles que soient les concentrations d'enzyme envisagées, puisque seules les liaisons arginine et lysine sont sensibles à son action.

Comme pour l'hydrolyse par l'enzyme 1 de *Pieris*, le seul examen des courbes de cinétique permet de conclure à la coupure des liaisons peptidiques dans la partie de la molécule comprise entre les ponts disulfure. En effet, un nombre minimum de cinq liaisons est hydrolysé, deux de ces liaisons seulement (Arg-Gly et Lys-Ala) se situent dans la partie C terminale de la chaîne B (tableau XV).

L'analyse des hydrolysats en fin de réaction permet de révéler huit taches positives à la ninhydrine (figure 34). Le schéma est différent de celui qui est obtenu avec l'enzyme 1, pas de phénylala-

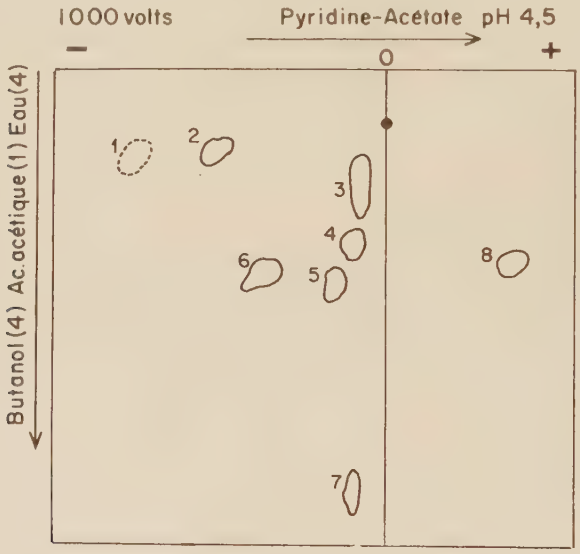


Figure 34.

Séparation par électrochromatographie des produits d'hydrolyse de l'insuline native par l'enzyme 2.

nine : de tyrosine et de leucine, par contre il semble que nous ayons en 4 une tache correspondant à l'alanine C terminale de la chaîne B.

L'interprétation que nous proposons de ce chromatogramme (tableau XVII) peut être expliquée en tenant compte de la spécificité de l'enzyme d'hydrolyse et de la structure de substrat.

Tableau XVII

Interprétation de l'hydrolyse de l'insuline par l'enzyme 2

Taches	Révélations spécifiques					Migration en électrophorèse	Nature possible
	Arg	His	Tyr	Cyss	Pro		
1	+					—	Arginine libre
2					+	—	Peptide 44 à 50
3	+		+	+		0	17———21 | S | S | 39———43
4						0	Alanine libre
5						0	Peptide 14 à 17
6		+		+		—	1———14 | S | S | 22———32
7			+			0	Peptide 37 à 39
8						+	Peptide 33 à 37

Théoriquement les liaisons rompues sont les suivantes :

— liaison Leu-Tyr et Leu-Val libérant la partie N terminale
13 14 32 33
de la molécule.

— liaison Leu-Glu libérant le peptide 14 à 17.
16 17

— liaisons Leu-Tyr et Leu-Val libérant les peptides 33 à 37
36 37 38 39
et 37 à 39.

— liaison Arg-Gly libérant le peptide 44 à 50 et le peptide
43 44
39 à 44 relié à la partie C terminale de la chaîne A par un pont disulfure.

— liaison Lys-Ala libérant l'alanine terminale de la chaîne B.
50 51

soit au total l'hydrolyse de sept liaisons libérant six peptides et un acide aminé : l'alanine.

C'est effectivement ce que nous obtenons après l'analyse des produits d'hydrolyse par électrochromatographie. Il nous reste à expliquer la nature de la tache 1 faiblement positive à la ninhydrine et au réactif de l'arginine. La libération de cet acide aminé implique l'hydrolyse de la liaison Glu-Arg, or cet enzyme, nous l'avons

42 43

constaté par l'hydrolyse des substrats, est en principe sans action sur la liaison carboxylique de l'acide glutamique ; la seule explication possible reste l'hydrolyse au niveau du radical NH_2 de l'arginine, hydrolyse plus lente que celle qui a lieu normalement au niveau du carboxyle de cet acide aminé.

De toute manière, l'hydrolyse de l'insuline native par l'enzyme 2 est explicable par la spécificité précédemment démontrée, spécificité plus large que celle de la trypsine.

Il convient de signaler que l'hydrolyse réalisée par les deux protéases à pH 9,5 est encore possible au pH 8,8 (donc en dehors de la zone optimum d'activité) et donne des résultats identiques. A ce pH les protéases conservent encore 30 p. 100 de leur activité.

3. — Conclusions

L'emploi des polypeptides naturels de structure connue nous a permis de préciser la spécificité de chacune des protéases de *Pieris*, notamment en ce qui concerne l'hydrolyse des liaisons lysine, leucine et alanine. La nature des liaisons hydrolysées, déjà suggérée par l'utilisation des substrats synthétiques, se trouve plus clairement démontrée par l'étude des produits résultant de l'action de ces enzymes sur une chaîne peptidique.

Bien que difficile à interpréter, l'hydrolyse de l'insuline par chacune des protéases est particulièrement intéressante en ce sens qu'elle montre l'efficacité de ces enzymes en présence de ponts disulfure.

C. — EFFICACITÉ DE L'ASSOCIATION DES DEUX ENZYMES : HYDROLYSE DE L'INSULINE ET DES PROTÉINES NATIVES

Nous avons étudié l'action de chacune des protéases de *Pieris* sur des substrats de complexité croissante. Nous aimerions maintenant mettre en évidence l'efficacité de préparations résultant de l'association des deux enzymes vis-à-vis de l'insuline et des protéines natives. Car, en fait, le but principal de l'étude de ces protéases reste l'explication de leur action sur le cristal de *B. thuringiensis*, protéine cristalline, activée au cours de la protéolyse.

1. — Action simultanée des enzymes sur l'insuline native

Lorsqu'une préparation enzymatique stade II (donc contenant les deux enzymes) est mise en présence d'insuline à pH 9,5 et 35°

dans les conditions précédemment envisagées, l'hydrolyse qui en résulte met en jeu la spécificité de chacune des protéases.

Nous devons alors observer l'hydrolyse des liaisons basiques, aromatiques et aliphatiques (leucine et alanine), soit un spectre d'action très étendu, ces différentes liaisons étant d'ailleurs hydrolysées avec des vitesses différentes.

Nous avons réuni dans la figure 35 les courbes de cinétique correspondant à l'hydrolyse de l'insuline native par une préparation stade II et par différentes protéases de spécificité voisine : trypsine, chymotrypsine et pepsine au pH optimum de leur action. Nous constatons les faits suivants :

1° L'efficacité des protéases gastro-intestinales des animaux supérieurs est très inférieure à celle des protéases de *Pieris*. Ainsi la pepsine, malgré son pH optimum en milieu acide (1,6) et sa spécificité plus large que celle de la trypsine ou de la chymotrypsine, libère au maximum 3 mEq NH_2/mM de substrat, quelles que soient les concentrations d'enzyme envisagées.

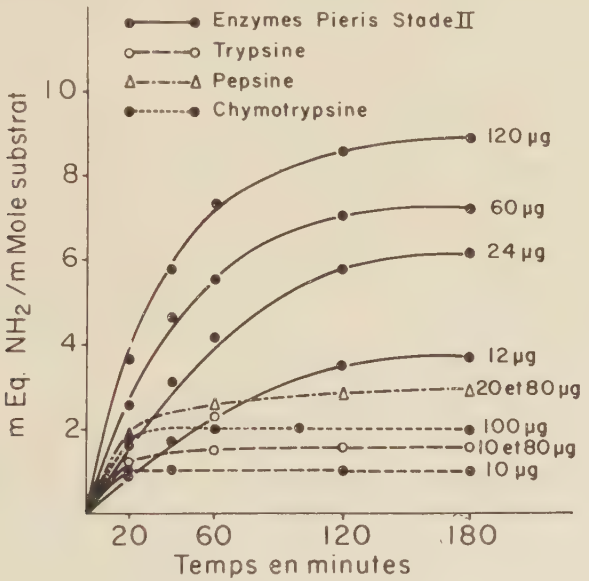


Figure 35.

Action simultanée des deux enzymes de Pieris (préparation Stade II) sur l'insuline native.

2° L'hydrolyse par la préparation de *Pieris* stade II, comme l'hydrolyse par les protéases séparées, est proportionnelle aux concentrations d'enzyme, mais pour chaque concentration envisagée le maximum d'hydrolyse par la préparation stade II est supérieur

à celui qui résulte de l'action de chacun des enzymes. Cette différence est particulièrement nette en ce qui concerne les plus faibles concentrations d'enzymes.

L'association des deux protéases donne à la préparation enzymatique une efficacité plus grande qui se traduit d'ailleurs par l'augmentation du nombre des produits d'hydrolyse correspondant à la somme des liaisons rompues. C'est ainsi par exemple que l'analyse par électrochromatographie permet de révéler 13 taches parmi lesquelles les acides aminés libres : tyrosine, phénylalanine, leucine et alanine (figure 36). Seule la partie N terminale de la molécule constituée par des liaisons qui ne sont pas sensibles à ces enzymes résiste à l'hydrolyse.

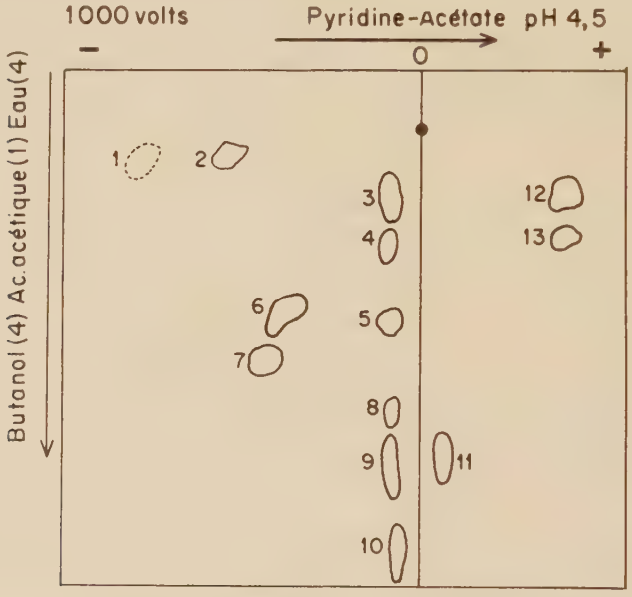


Figure 36.

Séparation par électrochromatographie des produits d'hydrolyse de l'insuline native par une préparation enzymatique de Pieris au Stade II.

2. — **Hydrolyse d'une protéine native : l'albumine bovine**

Les résultats obtenus par l'étude de l'hydrolyse de l'insuline nous incitent à envisager l'action de ces enzymes sur des protéines qui ne sont pas, ou très faiblement, attaquées par d'autres protéases, à l'état natif : l'albumine bovine par exemple.

Une solution d'albumine à 1 p. 100 est incubée à 35° en présence d'une préparation enzymatique stade II, à diverses concen-

trations comprises entre 4 et 40 µg/ml, en milieu tamponné de pH 9,5. L'hydrolyse est estimée quantitativement selon la technique de Kunitz (94) utilisée pour le dosage de l'activité enzymatique.

Dans une même expérience on soumet la protéine à l'action de la trypsine et de la chymotrypsine à leur pH optimum d'activité : 8,0. Dans ces conditions, nous voyons (figure 37) que la protéine native est attaquée par les enzymes de *Pieris*, le maximum d'hydrolyse est cependant inférieur à celui qui est observé après dénaturation. Par contre, nous remarquons (figure 38) qu'avec la trypsine, la chymotrypsine ou le mélange de ces deux enzymes, l'hydrolyse de la protéine native est pratiquement nulle.

A la suite de ces résultats, nous serions tentée de généraliser et de conclure que les enzymes de *Pieris* hydrolysent les protéines natives.

Nous savons que les protéines sous leur forme native résistent généralement à la protéolyse (10) (94) et il a été suggéré par Linderstromlang (104) que toutes les protéines sont digérées par les protéases sous une forme dénaturée, selon le schéma :

$$\begin{array}{rl} & \longrightarrow \text{ enzyme} \\ N \longleftarrow D \longrightarrow & \text{produits de la réaction} \end{array}$$

les deux formes native et dénaturée étant en équilibre.

Or, les expériences que nous avons décrites sont réalisées à pH 9,5, pouvons-nous estimer qu'à ce pH les protéines sont encore à l'état natif ?

On pourrait évidemment penser que le pH de 9,5, nécessaire à l'action des protéases de *Pieris*, provoque une dénaturation de l'albumine, suffisante pour permettre l'attaque enzymatique, impossible à pH 8,0, dans le cas de la trypsine ou de la chymotrypsine. Nous avons essayé de voir s'il se produit au pH 9,5 une dénaturation irréversible de la protéine. Pour ce faire, nous avons maintenu une préparation d'albumine bovine à ce pH 9,5, pendant 1 heure à 35°. La solution ainsi traitée est ensuite ramenée à pH 8,0 par dialyse et soumise à l'action de la trypsine et de la chymotrypsine. Dans ces conditions, l'hydrolyse de la protéine est encore pratiquement nulle. Il ne semble donc pas que la préincubation à pH 9,5 ait provoqué des changements importants de la structure de la protéine. Il n'est cependant pas exclu qu'il s'agisse d'une dénaturation réversible ayant pour résultat de démasquer des liaisons sensibles à l'action des enzymes et de les rendre ainsi plus accessibles à l'hydrolyse. L'influence du pH sur la protéolyse pourrait encore s'expliquer par l'instabilité plus grande de la protéine dans certaines zones de pH ; il est par exemple admis que les protéines sont plus facilement digérées lorsqu'elles sont instables au pH optimum de l'enzyme considéré (36). C'est ainsi que certaines protéines peuvent être digérées par la pepsine, à cause du pH optimum très acide de cet enzyme (< 2).

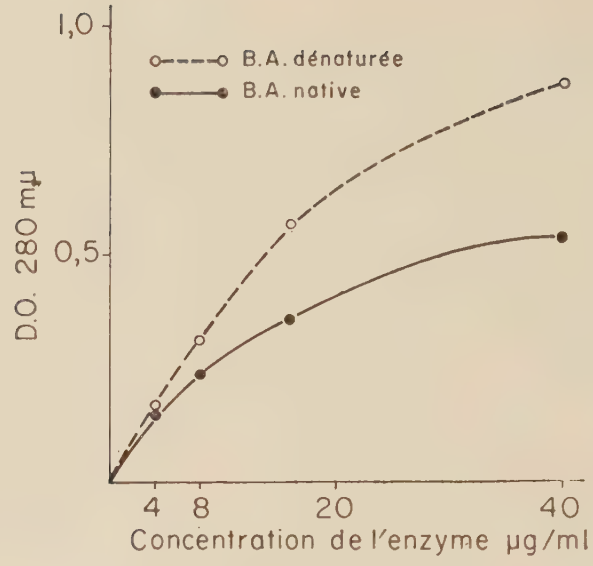


Figure 37.

Hydrolyse de l'albumine bovine (B.A.) par une préparation enzymatique de Pieris au Stade II. pH de l'expérience : 9,5.

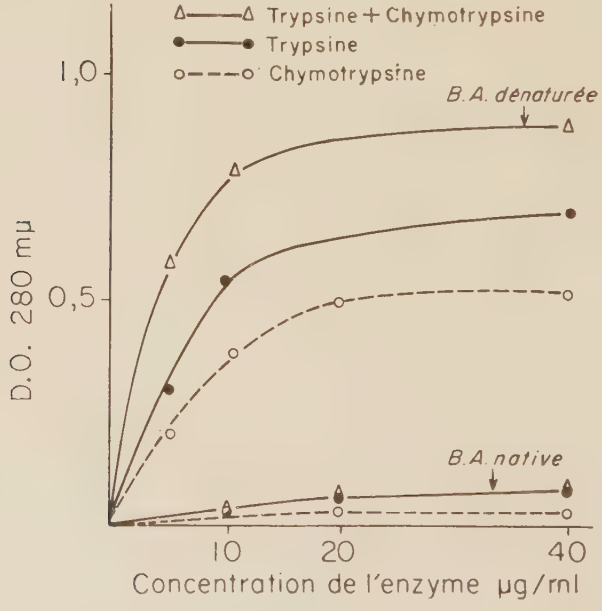


Figure 38.

Hydrolyse de l'albumine bovine (B.A.) par la trypsine et la chymotrypsine. pH de l'expérience : 8,0.

Des considérations de cet ordre pourraient s'appliquer à l'hydrolyse des protéines natives par les enzymes de *Pieris*, bien que le pH de 9,5 nécessaire à leur action soit moins éloigné de la neutralité que le pH optimum de la pepsine. Nous devons d'ailleurs préciser que ces protéases sont encore actives à pH 9,0, pH auquel la trypsine, encore active sur albumine dénaturée, reste inefficace vis-à-vis de la protéine native.

Si l'influence du pH sur la protéolyse contribue dans une certaine mesure à expliquer l'hydrolyse des protéines natives par les enzymes de *Pieris*, nous devons cependant tenir compte de la spécificité particulière de ces protéases et de leur efficacité en présence de ponts disulfure. Ces différents facteurs, dont la résultante est l'accessibilité plus grande des sites actifs des enzymes aux liaisons sensibles à leur action, facilitent l'explication du mécanisme de protéolyse lorsque le substrat est une protéine n'ayant pas subi une dénaturation irréversible de sa structure.

D. — CONCLUSIONS

Les protéases que nous avons séparées et obtenues, semble-t-il, à l'état pur présentent des spécificités très différentes. L'une hydrolyse les liaisons au niveau du carboxyle de l'arginine et à vitesse moindre de la lysine, de la leucine et de l'alanine ; la deuxième agit au niveau de tous les acides aminés aromatiques, de la leucine et de l'alanine à vitesse égale. Bien qu'elles puissent être rattachées par certaines de leurs caractéristiques au groupe trypsine, chymotrypsine, elles diffèrent de ces deux enzymes par une spécificité plus large et par leur vitesse d'action plus grande sur les amides et surtout sur les dipeptides substitués. Leur action ne se limite pas à des chaînes peptidiques simples. Chacune de ces protéases est capable d'agir sur des chaînes peptidiques reliées entre elles par des ponts disulfure dont la présence ne semble pas diminuer l'action enzymatique. Cette particularité de leur action a pu être mise en évidence par l'hydrolyse de l'insuline et d'une protéine native : l'albumine bovine.

CHAPITRE IV

LE CRISTAL DE BACILLUS THURINGIENSIS

Nous avons dû purifier les protéases du chyle de *Pieris brassicae* et définir les conditions de leur action sur les protéines avant de revenir à ce qui fut le point de départ de ce travail : le cristal de *B. thuringiensis* et son hydrolyse enzymatique.

Les cristaux de *B. thuringiensis* constituent un substrat naturel, *in vivo*, des protéases de *Pieris*, à la suite de leur administration orale aux chenilles. Il nous a semblé nécessaire de mieux définir et de caractériser ce substrat avant d'envisager son hydrolyse. Nous consacrerons la première partie de ce chapitre à l'étude des cristaux de *B. thuringiensis*. Ensuite, nous étudierons l'hydrolyse enzymatique des cristaux par les préparations de *Pieris* et par différentes protéases.

A. — QUELQUES DONNÉES SUR LA COMPOSITION ET LA STRUCTURE DES CRISTAUX

Nous avons déjà mentionné au début de ce travail l'origine des cristaux et leur nature supposée protéique. Rappelons simplement que leur formation est concomitante de celle de la spore, dans les différentes espèces bactériennes envisagées, et qu'ils peuvent être considérés comme un produit secondaire de la sporulation, d'où le terme fréquemment employé d'inclusion parasporale pour les désigner.

Dans une série d'études consacrées à la sporulation de différentes variétés de *Bacillus cereus*, Young et Fitz-James (184) étudient en particulier la formation de la spore et de la protéine parasporale de *B. thuringiensis* sérotype III (*) ; ils montrent l'apparition d'une inclusion très petite au voisinage immédiat de la première ébauche de la spore (185). Le développement de cette inclusion est parallèle à celui de la spore; au cours des derniers stades de la sporogénèse, elle atteint sa taille maximum et devient

(*) *B. thuringiensis* Serotype III selon la classification de Barjac-Bonnefoi (13) est encore appelé par les auteurs (185) *B. cereus var Alesti.*

réfringente. Formation de la spore et synthèse du cristal peuvent d'ailleurs être inhibés par les mêmes facteurs au cours de la croissance, par exemple après addition d'azaguanine (186).

Ces même auteurs ont pu extraire les protéines qui constituent le cristal, au cours de la sporulation, par dissolution en milieu alcalin de pH 11,5, en présence de thioglycolate 1 p. 100 (185). Ils suggèrent la formation de liaisons disulfure entre les chaînes protéiques, au moment de la maturation du cristal.

La synthèse d'une telle molécule organisée, de nature protéique, a suscité différents travaux et notamment ceux de Monro (121) (122). Par des études immunologiques, cet auteur a pu montrer que l'antigénicité du cristal croît pendant la sporulation et qu'il n'existe pas, dans la cellule, de précurseurs présentant la même antigénicité. Par l'utilisation d'acides aminés marqués, cet auteur a de plus montré que le cristal est synthétisé pendant la sporulation à partir des acides aminés provenant de la dégradation des cellules végétatives (123).

Au cours des étapes terminales de la sporulation, les chaînes peptidiques pourraient alors être reliées entre elles selon l'hypothèse de Young et Fitz-James (185), et s'organiser pour donner au cristal sa réfringence et sa structure. D'après une étude de Norris et Watson (130), réalisée au microscope électronique, sur des cultures de *B. thuringiensis* sérotype III, la formation du cristal serait intimement associée au matériel nucléaire du sporange. Après leur maturation, les cristaux manifesteraient un aspect lamellaire dû à une certaine périodicité dans leur structure ; l'arrangement régulier des chaînes protéiques selon l'axe du cristal tétragonal serait organisé avec une périodicité de 252 Å.

Nous donnons ici (figure 39) la reproduction du cliché de Norris et Watson, obtenu au microscope électronique, après avoir ombré la préparation au moyen de palladium. Nous remarquons la structure régulière de cette molécule géante qui est en réalité une protéine cristalline et qui, de ce fait, présente un intérêt considérable.

1. — Composition chimique des cristaux

Nous avons déjà parlé des travaux de Hannay et col. sur *B. thuringiensis* var Berliner (sérotype I), puis de Angus sur *B. thuringiensis* sotto (sérotype IV) (75) (7). Ces auteurs ont les premiers montré la nature protéique des inclusions cristallines. Ils ont conclu que les préparations pures de cristaux ne contiennent pas de phosphore, contiennent de 16 à 18 p. 100 d'azote (selon les préparations et les conditions de culture). Par chromatographie sur papier, Angus (7) a déterminé la composition en acides aminés des cristaux de la souche Sotto. Nous nous sommes basée sur ces différents résultats pour reprendre l'étude des cristaux de la souche *B. thuringiensis* var Berliner. Nous avons d'abord vérifié la nature protéique des inclusions de cette souche.

Figure 39.

Le cristal de B. thuringiensis.
Cliché obtenu par Norris (130) *au microscope électronique.*

a) **Nature protéique des cristaux**

Nous avons tout d'abord vérifié l'absence de sucres ou de dérivés des sucres, en dosant les oses totaux par la méthode à l'orcinol précédemment décrite. Le dosage a été effectué sur 2,5 mg d'une suspension de cristaux et n'a révélé la présence d'aucune trace de sucres dans la prise d'essai. Ce résultat nous permet d'exclure, dans les préparations de cristaux, la présence de sucres libres ou engagés dans des nucléotides ou des complexes glucoprotéiques.

Chaque préparation de cristaux est soumise aux différents

tests suivants (dont la concordance permet de contrôler la nature protéique de l'inclusion) :

— Poids sec sur un volume donné de la préparation : les cupules de verre, préalablement chauffées puis tarées, sont laissées à l'étuve à 110 degrés avec leur contenu, pendant 48 heures, et jusqu'à poids constant.

— Dosages de protéines, selon la méthode de Lowry : une fraction donnée de la préparation est solubilisée dans la soude 0,1 N, et le dosage des protéines est effectué sur cette solution. La quantité de protéines, exprimée en mg/ml, et calculée au moyen d'une gamme référence d'albumine bovine, correspond exactement (à ± 0,5 p. 100 près) à la valeur du poids sec trouvée pour la préparation considérée.

— Dosages d'azote : le dosage, selon la technique colorimétrique de Nessler adaptée par Johnson (87), est effectué sur une fraction de la dissolution sodique utilisée pour le dosage de protéines, après minéralisation. Nous obtenons, pour la souche considérée, un pourcentage d'azote compris entre 15,6 et 16,2, selon les

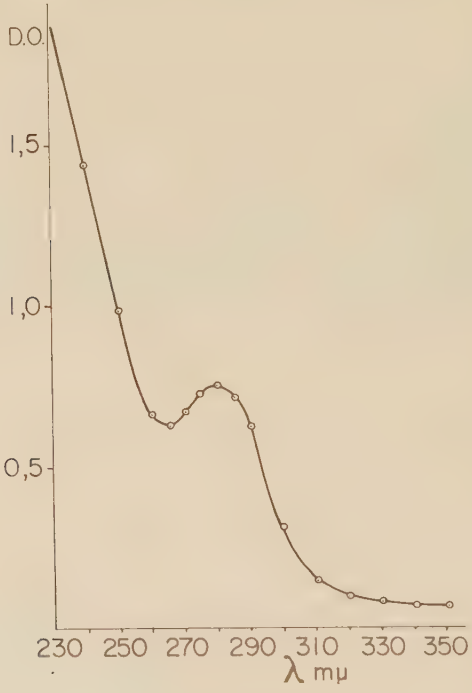


Figure 40.

Spectre d'absorption dans l'ultraviolet d'une préparation de cristaux de B. thuringiensis solubilisés par la soude 0,01 *N.*

préparations. Les légères variations observées d'une préparation à l'autre peuvent provenir de la présence d'un faible pourcentage de spores dans les préparations. Ainsi, par exemple, pour une préparation de cristaux, nous avons obtenu les résultats suivants :

poids sec : 2,3 mg/ml
protéines : 2,35 mg/ml
azote : 360 µg/ml; soit 15,7 p. 100 de 2,3 mg/ml.

Ces résultats, obtenus avec la souche *Berliner*, confirment la nature exclusivement protéique des cristaux.

Enfin, nous avons mesuré l'absorption dans l'ultraviolet d'une solution de cristaux (0,5 mg/ml) dans la soude 0,01 N, pour les longueurs d'ondes comprises entre 240 et 350 mµ. Le spectre donné par cette préparation (figure 40) présente le maximum d'absorption à 280 mµ caractéristique des protéines.

b) Composition en acides aminés

L'analyse quantitative de la composition en acides aminés des cristaux de la souche Berliner et de la souche Anduze (sérotype III) a été effectuée à l'auto-analyseur selon la technique automatique de Moore et Spackmann (124) modifiée par Piez et Morris (134). Un échantillon contenant 1 mg de cristaux est soumis à l'hydro-

Tableau XVIII

Composition en acides aminés des cristaux de B. thuringiensis

	Acides aminés : p. 100		
	var Berliner (*)	var Anduze	var Sotto
Aspartique	12,57	11	9,5
Thréonine	5,76	5,1	5,2
Sérine	4,37	5,6	5,6
Glutamique	12,0	13,4	12,9
Proline	4,37	5,9	6,7
Glycine	4,25	4,5	2,7
Alanine	3,80	4,1	3,2
Cystine	1,35	1,34	1,1
Valine	5,0	5,3	5,0
Méthionine	1,53	1,65	0,6
Isoleucine	4,4	5,1	
Leucine	7,65	7,93	10,4
Tyrosine	6,62	5,9	3,9
Phénylalanine	6,77	5,2	7,4
Lysine	3,4	4	4,2
Histidine	2,65	3,3	1,7
Arginine	7,81	7,5	9,4
Tryptophane	2,05	1,76	2,1

(*) Cette analyse a été réalisée dans le Laboratoire de M.-P. Jolles, auquel nous adressons nos vifs remerciements.

lyse acide par HCl 6 N, redistillé, pendant 18 heures, à 109 degrés, en tube scellé et sous vide. L'analyse chromatographique de cet hydrolysat a donné les résultats mentionnés dans le tableau XVIII. Ces résultats sont exprimés en pourcentages, puisque le poids moléculaire des inclusions n'est pas connu.

Dans le cas de la souche Berliner qui nous intéresse ici, nous pouvons remarquer la prédominance des acides aminés dicarboxyliques : aspartique 12,57 p. 100 et glutamique 12 p. 100 ; viennent ensuite : l'arginine 7,87 p. 100, le groupe leucine et isoleucine qui totalise 12 p. 100, puis les acides aminés aromatiques: phénylalanine 6,77 p. 100 et tyrosine : 6,62 p. 100. Le pourcentage des autres acides aminés est plus faible. Par cette technique, le trytophane n'est pas dosé puisqu'il se trouve détruit au cours de l'hydrolyse acide ; le dosage de cet acide aminé, selon la technique de Spiez et Chambers (163) a été effectué sur une solution de cristaux (4 mg/ml) dans NaOH 0,1 N, nous avons trouvé un pourcentage de 2,05. La composition des cristaux de la souche Anduze est tout à fait comparable. Nous remarquons cependant quelques différences, notamment en ce qui concerne les acides aminés aromatiques : phénylalanine (5,2 p. 100) et tyrosine (5,9 p. 100) dont la proportion est nettement plus faible que dans le cas de la souche Berliner.

Des résultats assez voisins avaient été obtenus par Angus (7) avec les cristaux de la souche Sotto, par une technique de chromatographie sur papier, dont la précision est moins grande que celle de la technique automatique de Moore. Pour la souche Sotto, le pourcentage en aspartique est de l'ordre de 9,5 et en glutamique de 12,9 p. 100, le groupe leucine-isoleucine totalise 10 p. 100 et l'arginine 9 p. 100. Il semble que la composition en acides aminés des inclusions cristallines varie assez peu selon les différentes souches. Nous remarquons toujours la prédominance des acides dicarboxyliques et du groupe leucine.

2. — **Solubilisation des cristaux : action des réducteurs de liaisons disulfure**

La solubilisation des cristaux de *B. thuringiensis* peut être obtenue de trois manières différentes :

1° Par alcalinisation du milieu au-delà de pH 11,8 ; les premiers auteurs qui ont étudié les cristaux, Hannay (75) et Angus (6) (7) ont mis en évidence leur solubilité dans NaOH 0,05 N. La dissolution sodique présente les mêmes caractères que les suspensions de cristaux et est toxique par la seule voie orale.

2° Par hydrolyse enzymatique sous l'action des protéases de *Pieris ;* ce mode d'hydrolyse est une réaction complexe, au cours de laquelle le cristal protoxine est transformé en toxine vraie, active par injection. Nous l'envisagerons plus spécialement dans la suite de ce chapitre.

3° Par action des réducteurs de liaisons disulfure : ce dernier

procédé de solubilisation nous semble particulièrment intéressant à cause des renseignements qu'il peut apporter quant à la structure du cristal et à l'explication du mécanisme de protéolyse. Par ce procédé la toxicité vraie est également démasquée selon un processus autre que celui de la protéolyse. Nous avons vu que Young et Fitz-James (189) ont les premiers montré la solubilité des cristaux dans le thioglycolate 1 p. 100 à pH 11,5 et supposé l'existence de liaisons disulfure qui confèrent à l'inclusion sa structure figurée.

a) **Action des réducteurs : expériences quantitatives**

Dans une première série d'expériences, nous avons envisagé l'action de la cystéine et du thioglycolate à diverses concentrations, sur une suspension diluée de cristaux, dont la dissolution est suivie par mesure de la densité optique dans les tubes de l'incubation. A une suspension de cristaux (dont la concentration

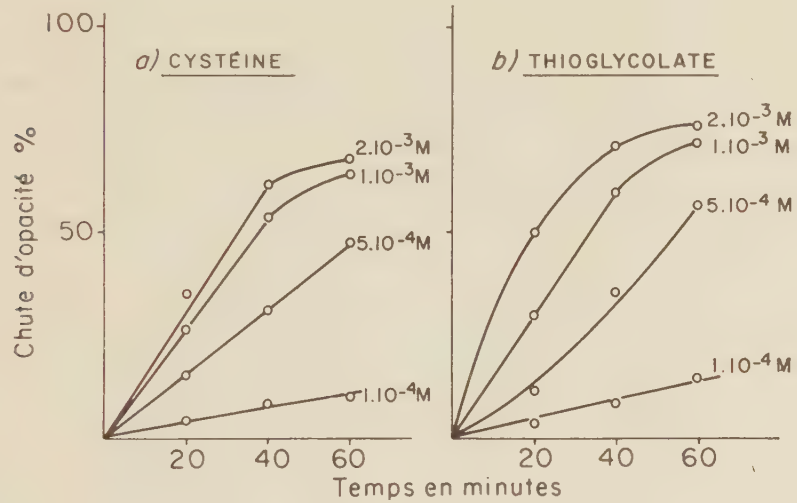


Figure 41.

Action de la cystéine et du thioglycolate sur une suspension de cristaux.
La chute d'opacité des préparations, exprimée en p. 100, *permet de suivre quantitativement la dissolution en fonction du temps et des concentrations de réducteur.*

est de 160 µg/ml) en tampon bicarbonate 0,05 M de pH 9,5, on ajoute des quantités croissantes de réducteur, de manière à obtenir des concentrations finales, comprises entre 10^{-4} et 2.10^{-3} M. L'incubation est réalisée à 30° pendant 1 heure et la densité optique des suspensions est appréciée par lecture directe au photo-

mètre Meunier, avec un filtre orange. La dissolution est une fonction directe de la chute d'opacité exprimée en p. 100, à des temps donnés de l'incubation.

Nous voyons (figure 41) que la lyse est proportionnelle au temps d'incubation et aux concentrations de réducteur, elle atteint 70 p. 100 après 1 heure d'incubation dans les conditions envisagées.

L'examen au microscope à contraste de phase, en cours de dissolution, permet aussi de suivre la progression de la lyse : les cristaux commencent par perdre leur réfringence, puis on observe un gonflement, immédiatement suivi de la disparition de la structure cristalline et de la dispersion des éléments figurés. Ces changements morphologiques sont plus nettement mis en évidence au microscope électronique par l'examen direct d'une suspension de cristaux, avant et après addition de thioglycolate à diverses concentrations (figure 42).

[b]

Figure 42.

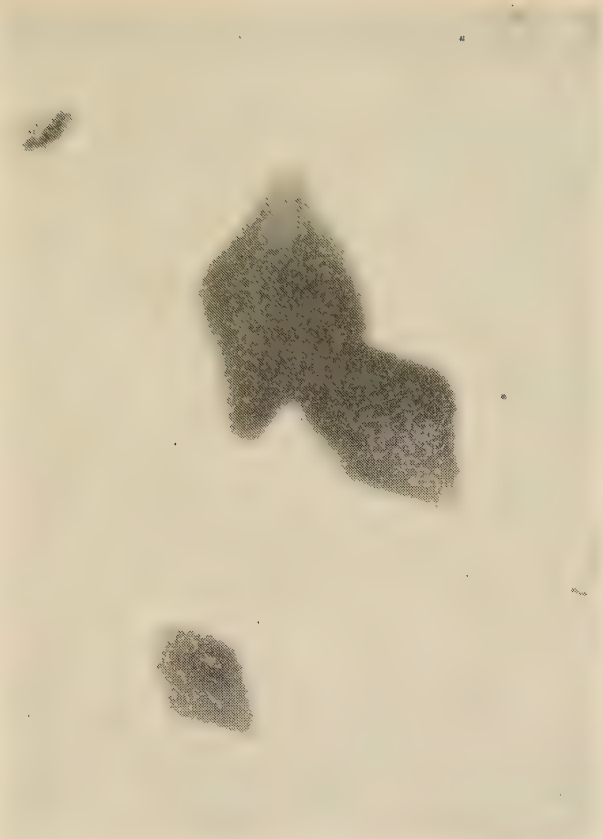
Examen au microscope électronique de la dissolution des cristaux, sous l'action du thioglycolate à différentes concentrations.

a) *Suspension de cristaux avant l'addition du thioglycolate.*

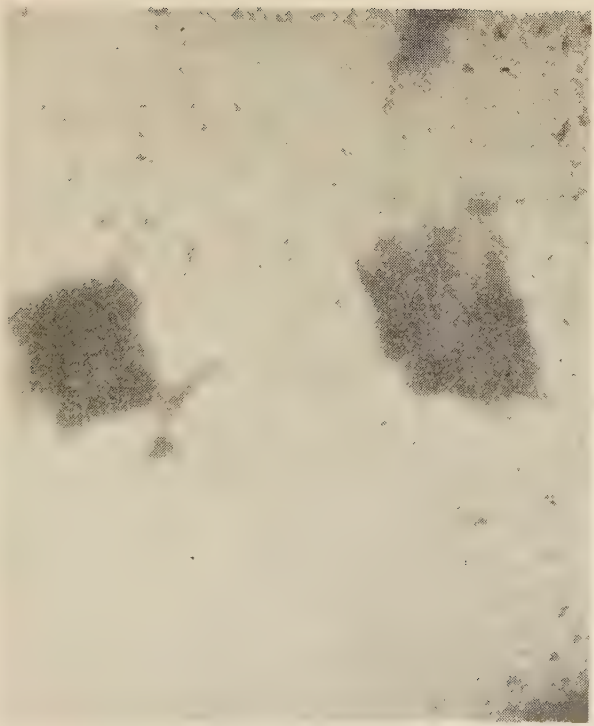
b) *Action du thioglycolate* 0,005 *M.*

c) *Action du thioglycolate* 0,01 *M.*

Cette expérience a été réalisée dans le Service de Photomicrographie de l'Institut Pasteur, grâce à la collaboration de Mme A. Rytter, à qui nous exprimons notre vive gratitude.



[b]



[c]

Par addition de cystine, en cours de dissolution, nous avons cherché à voir dans quelle mesure la réaction est réversible. Dans une expérience identique aux précédentes, nous avons examiné l'action de la cystéine à la concentration 10^{-3} M sur la même suspension de cristaux ; au début de l'incubation, après 10 à 20 minutes, nous avons ajouté la cystine à la concentration 2.10^{-3} M. Dans ces conditions (figure 43), nous observons un arrêt immédiat de

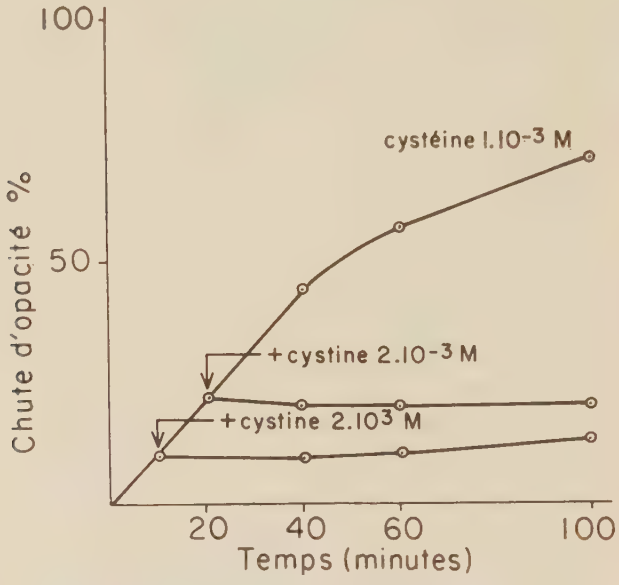


Figure 43.

Influence de l'addition de cystine au cours de la dissolution d'une suspension de cristaux par la cystéine.
Les flèches indiquent le moment où la cystine, à la concentration 2.10^{-3} *M, a été ajoutée dans le milieu de réaction contenant la cystéine à la concentration* 1.10^{-3} *M.*

la dissolution et la chute d'opacité se maintient à la valeur obtenue au moment de l'addition de la cystine. A ce moment, le processus de dissolution était commencé, les cristaux perdaient leur réfringence, mais la structure n'était pas encore dispersée. Après addition de cystine, ce processus est stoppé et une partie des cristaux retrouvent leur réfringence, la cohésion de leur structure est ainsi reconstituée à l'état primitif. La présence de cystine permet, dans une certaine mesure, la reconstitution des liaisons disulfure à condition toutefois que le processus de dissolution ne soit pas très avancé. Il semble donc bien que la structure figurée des

cristaux soit uniquement assurée par la formation de ces liaisons entre les chaînes protéiques.

Après ces expériences quantitatives réalisées sur des suspensions diluées de cristaux, nous avons effectué la dissolution sur des préparations plus concentrées et déterminé les conditions de réduction à plusieurs pH. Les concentrations de cristaux utilisées sont de 5 et 10 mg/ml ; dans chacun de ces cas, l'action des réducteurs est étudiée aux pH 7,8, 8,8 et 9,5 en absence ou en présence d'urée. Le réducteur utilisé est le thioglycolate à la concentration 0,1 M. La dissolution est effectuée à 37° pendant 1 heure. Après l'incubation, les suspensions sont centrifugées et les protéines libérées par la dissolution sont dosées dans les surnageants, par la méthode de Lowry. Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau XIX et suggèrent les commentaires suivants :

1° en l'absence d'urée, la dissolution est de l'ordre de 75 à 90 p. 100, pour les pH 9,5 et 8,8 quelle que soit la concentration en cristaux.

Tableau XIX

Dissolution des cristaux par le thioglycolate à divers pH

Concentration des cristaux mg/ml	Concentration des protéines dans les surnageants		
	pH 7,8	pH 8,8	pH 9,5
1) 5 mg/ml	1 mg/ml	4,450 mg/ml	4,66 mg/ml
2) 10 mg/ml	4 mg/ml	7,2 mg/ml	8,1 mg/ml
3) 5 mg/ml cristaux + urée 6 M	1,5 mg/ml	4,4 mg/ml	4,6 mg/ml
4) 10 mg/ml cristaux + urée 6 M	6,1 mg/ml	7,6 mg/ml	8,2 mg/ml

La dissolution est effectuée à 37°, pendant 1 heure, par le thioglycolate à la concentration 0,1 M, à chacun des pH envisagés, et le dosage des protéines est effectué après centrifugation des différentes préparations.

En 3 et 4, la dissolution a lieu en présence d'urée 6 M.

2° en présence d'urée, les mêmes pourcentages sont obtenus aux pH 9,5 et 8,8 à pH 7,8, ils sont légèrement inférieurs.

3° la dissolution à pH 7,8 est faible, elle n'est augmentée que d'un tiers environ après addition de l'urée.

Bien que la solubilisation des cristaux par réduction soit possible jusqu'à pH 7,8, elle n'est que partielle dans ce cas et nous devons admettre que l'élévation du pH jusqu'à 9 facilite le processus de réduction.

b) **Dosage des groupements — SH**

Nous avons utilisé cette propriété qu'ont les cristaux d'être facilement solubilisés par les réducteurs, pour doser le nombre de résidus cystéine, sous la forme réduite, après action du thioglycolate. Cette technique a notamment été utilisée par Anfinsen et Haber (3) (72) pour le dosage des groupes -SH de la ribonucléase.

La dissolution est effectuée de deux manières : en absence et en présence d'urée : dans ce dernier cas, on peut espérer qu'aucune liaison -S-S ne résistera à l'action des réducteurs. Une suspension de cristaux en tampon bicarbonate 0,05 M de pH 9,5, à raison de 10 mg/ml est traitée par le thioglycolate, à la concentration finale 0,1 M. A une deuxième suspension, préparée de la même manière, on ajoute de l'urée à la concentration 6 M. Les deux préparations sont agitées pendant 1 heure à 37°, puis centrifugées, après dissolution, de manière à obtenir une solution parfaitement limpide. Cette solution est ensuite filtrée sur une petite colonne de Sephadex G-25 (1,2 × 13 cm pour 10 mg de protéines) pour éliminer l'excès de réactif ; les protéines réduites sortent en début d'élution. Ces fractions sont réunies et le dosage des groupes -SH est effectué au moyen du paramercuribenzoate, selon la technique de Boyer (28) réalisée de la manière suivante :

Dans une cuve de Beckman de 1 cm de trajet optique, on dispose :

0,9 ml de tampon acétate de sodium 1 M pH 4,5,
0,45 ml de solution de PMB (36 mg/100 ml à pH 7,5),
1,65 ml d'eau distillée.

On lit la densité optique de cette préparation à 255 mμ ; on ajoute alors 0,1 ml dela prise d'essai de protéines, dont la concentration finale dans la cuve doit être de l'ordre de 0,1 mg. Après 5 minutes, on lit de nouveau la densité optique à 255 mμ; la différence entre les deux densités optiques correspond à l'absorption due à la formation du complexe cystéine-PMB. Le nombre de groupes -SH libérés par la réduction de la protéine est estimé par rapport à une gamme de cystéine dont la concentration est comprise entre 0,01 et 0,1 μMole/ml de milieu réactionnel. Etant donné l'absorption à 255 mμ de la protéine considérée, il est nécessaire de prévoir un témoin protéine sans PMB, dont la d.O. est soustraite de d.O observée après réaction avec le PMB.

Les résultats des dosages sont réunis dans le tableau XX. En absence d'urée, le nombre d'équivalents cystéine trouvés est compris entre 0,19 et 0,22 μMoles/mg de protéines, soit 2,3 à 2,6 p. 100 ; en présence d'urée, les résultats obtenus sont compris entre 2,66 et 3,1 p. 100, donc légèrement supérieurs au cas précédent.

Si l'on compare ces résultats avec les valeurs données par l'analyse quantitative des acides aminés, nous voyons que dans ce dernier cas nous trouvons 0,113 μMole de cystine/mg de pro-

téines, soit 0,226 µMole en résidus cystéine. Cette valeur correspond à celle que nous observons par le dosage des groupes -SH après réduction par le thioglycolate.

Tableau XX

Dosage des groupements — SH après dissolution des cristaux par les réducteurs

Préparation	Equiv. SH : µMoles/ml	Concentration protéines mg/ml	µMoles cystéine/ mg de protéines	Cystéine p. 100
Dissolution par le thioglycolate M/10	0,025 0,018	0,107 0,098	0,22 0,19	2,66 2,3
Dissolution par le thioglycolate M/10 .... en urée 6 M.	0,035 0,015	0,160 0,06	0,22 0,26	2,66 3,1

Les dosages sont effectuées sur des fractions d'éluat après passage de 10 mg du produit de dissolution sur une colonne de Sephadex G-25 1,2 x 13 cm.

c) Analyse des constituants de la dissolution

L'objectif principal de l'étude de ce processus de dissolution était de rechercher la composition des produits de réduction, et de savoir, en particulier, le nombre de chaînes protéiques constituant l'inclusion cristalline.

L'analyse des produits de dissolution par ultracentrifugation et par électrophorèse sur gel d'amidon et la détermination des groupements N terminaux nous ont permis de dénombrer au moins trois constituants.

— Conditions de réduction et d'alkylation.

Les conditions de réduction et d'alkylation sont voisines de celles qui sont utilisées par Haber et Anfinsen (3) (72) pour la réduction de la ribonucléase. Les cristaux, à la concentration de 10 mg/ml sont mis en suspension, en tampon 0,1 M de pH 9,5, la réduction est effectuée par le thioglycolate à la concentration 0,1 M à 37°, pendant une heure. L'alkylation peut être réalisée, soit par addition d'iodacétate en excès, soit par action du PMB qui présente l'avantage de provoquer une alkylation réversible (3). Nous avons retenu cette dernière technique : la préparation réduite est passée sur une colonne de Sephadex G-25 équilibrée en

tampon bicarbonate 0,1 M de pH 9,5 contenant le PMB à la concentration 1.10^{-3} M. L'alkylation se trouve réalisée au cours de la migration des substances sur la colonne, d'autre part l'excès de réactif est retenu par le gel. La préparation ainsi obtenue est concentrée jusqu'à 15 mg/ml et amenée à pH 8,0, par dialyse contre une solution de véronal 0,05 M.

— *Analyse de la préparation par ultracentrifugation.*

Différentes préparations ont été soumises à l'ultracentrifugation : les préparations 1 et 2 correspondent à deux lots différents de cristaux, la préparation 3 a été réalisée avec un temps de réduction prolongé à 2 heures. Dans le tableau XXI, nous

Tableau XXI

Analyse par ultracentrifugation des produits résultant de la dissolution des cristaux par le thioglycolate

	Protéines mg/ml	s_1 (*)s	s_1 p. 100	s_2 s	s_2 p. 100	s_3 s	s_3 p. 100	s_4 s	s_4 p. 100
Préparation 1	9,6	0,84	50,7	4,8	16	9,6	22	11	non calculable
Préparation 2	10,8	0,83	30	6,06	25	9,05	41	27,04	4,7
Préparation 3	20,2	0,83	84	3,99	15	8,17	0,5		

Les préparations 1 et 2 correspondent à la dissolution de deux lots de cristaux différents, lorsque la durée de la réaction de réduction est de 1 heure:

La préparation 3 est identique à la préparation 1, la durée de la réaction de réduction est de 2 heures.

(*) s = Constante de sédimentation à 20°.

avons réuni les résultats obtenus avec les différentes préparations : les constituants sont au nombre de 3, cependant, dans la préparation 3, nous remarquons la présence d'un quatrième constituant en proportion faible.

Nous observons des variations d'un lot de cristaux à un autre (préparations 1 et 2). La proportion relative des différents constituants pourrait aussi dépendre des conditions expérimentales : en effet, dans la préparation 3, nous avons le même lot de cristaux qu'en 1, mais la durée de la réduction a été prolongée à 2 heures.

De toute manière, la détermination des pourcentages au cours de l'ultracentrifugation ne peut être réalisée avec précision, spécialement dans le cas des constituants de faibles poids moléculaires.

Malgré des variations, nous retrouvons toujours des résultats du même ordre, en ce qui concerne les constantes de sédimentation des trois constituants principaux et plus spécialement du constituant **s 1.** Ce constituant **s 1** qui existe dans toutes les préparations, aurait un poids moléculaire de l'ordre de 10 000 et pourrait être utilisé ultérieurement pour des études de structure.

— *Electrophorèse sur gel d'amidon.*

La présence de plusieurs constituants dans ces préparations a été mise aussi en évidence par électrophorèse sur gel d'amidon. L'utilisation de gels à l'urée est de plus en plus courante, elle a été d'ailleurs expérimentée par Poulik (141) et Grossberg (71) pour l'analyse des dérivés de réduction des globulines.

Nous avons utilisé pour ces expériences un gel à l'urée 6 M en tampon Borate de pH 8,6 selon la technique précédemment décrite. Les différentes préparations analysées en ultracentrifugation ont donné pour l'électrophorèse des diagrammes identiques, manifestant la présence de trois constituants, migrant vers l'anode à ce pH (figure 44). Ces trois constituants, différant par leur poids moléculaire, mais de mobilité voisine, peuvent être séparés sur gel à l'urée dont le pouvoir de séparation est très supérieur à celui du gel sans urée.

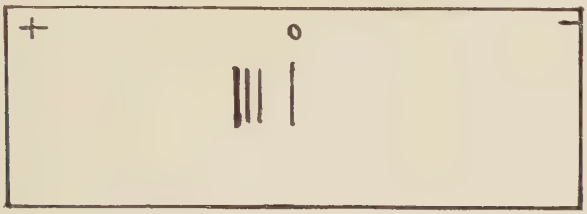


Figure 44.

Electrophorèse sur gel d'amidon d'une préparation résultant de la dissolution d'une suspension de cristaux par le thioglycolate.
Gel à l'urée 6 M de pH 8,6 — 18 heures — 5 volts/cm.

Les résultats obtenus par cette technique sont parallèles à ceux qui ont été donnés par l'ultracentrifugation.

— *Détermination des groupements N— terminaux.*

L'analyse des groupes N— terminaux de ces préparations selon la technique au dinitro-fluorobenzène de Sanger (149) (150) devait confirmer la présence de plusieurs constituants.

Le procédé d'analyse décrit au chapitre I a été appliqué aux différentes préparations dont la composition a été analysée par

ultracentrifugation. Dans tous les cas nous avons pu identifier les acides aminés suivants : DNP-Glu, DNP-Asp, DNP-Ser, DNP-Lys, que nous reconnaissons d'ailleurs sur les deux chromatogrammes unidimensionnels présentés dans la figure 45.

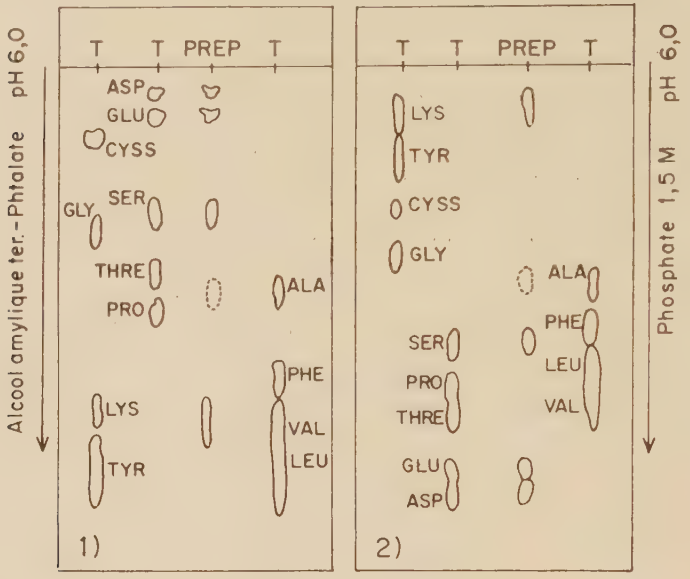


Figure 45.

Chromatographie des DNP-aminoacides terminaux des chaînes protéiques résultant de la dissolution d'une suspension de cristaux par le thioglycolate.

T : DNP aminoacides témoins.

Le dosage quantitatif de ces différents amino-acides, selon la technique de Levy (102) a donné des résultats du même ordre, pour les différentes préparations envisagées.

Nous remarquons (tableau XXII) la prédominance du DNP-Glu, alors que les DNP-Asp, DNP-Ser et DNP-Lys sont en proportion égale, nous avons mentionné la présence de traces d'alanine.

La détermination des groupes N— terminaux est une preuve supplémentaire de l'existence de plusieurs constituants protéiques dans les préparations solubles obtenues par réduction des cristaux.

Il est évidemment difficile d'expliquer par le dosage de ces groupes terminaux les résultats obtenus par ultracentrifugation, en ce qui concerne surtout le pourcentage de différents constituants. Seul, l'isolement de chacun de ces constituants permettra de les caractériser par l'un ou l'autre des groupes N— terminaux que nous avons déterminés. La séparation de ces protéines par

les techniques de chromatographie est difficile, étant donné leurs propriétés ioniques assez voisines. Cependant, le constituant de faible poids moléculaire **(0,83 s)** peut être isolé par chromatographie sur Sephadex G-50 ou G-75 ; de plus, ce constituant est dialysable, au cours d'une dialyse prolongée.

Tableau XXII

Détermination quantitative des groupements NH_2 terminaux des chaînes protéiques constituant les cristaux

Acides aminés terminaux	D.O à 360 mμ	Facteurs de Levy	μ Moles pour 50 mg de DNP protéine	Rapports moléculaires
DNP-Glutamique	0,34	0,94	0,3	3
DNP-Aspartique	0,192	0,99	0,2	2
DNP-Sérine	0,26	0,97	0,24	2
DNP-Lysine	0,32	0,64	0,19	2
DNP-Alanine	0,090	1,09	< 0,1	< 1

La densité optique des éluats des taches correspondant aux différents aminoacides est lue à 360 mμ au spectrophotomètre Beckman dans une cuve de 1 cm et multipliée par les facteurs propres à chaque aminoacide (102).

En résumé, les données recueillies par ces expériences de réduction du cristal nous permettent de mieux imaginer la structure de l'inclusion protéique de *B. thuringiensis*. Ce cristal est vraisemblablement constitué par plusieurs unités protéiques de poids moléculaire différent, assemblées entre elles par des liaisons disulfure ; il se pourrait encore qu'il s'agisse d'une seule chaîne protéique existant à différents degrés de polymérisation. La répartition de ces unités selon une certaine périodicité donne naissance à la molécule géante, dont nous avons décrit les caractéristiques.

B. — HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES CRISTAUX PAR LES PROTÉASES DE PIERIS

La dissolution des cristaux de *B. thuringiensis* peut donc être réalisée par d'autres voies que l'hydrolyse enzymatique. Les différentes préparations obtenues, soit par dissolution sodique, soit par action des réducteurs, pourraient évidemment servir de substrats aux protéases de *Pieris* que nous avons étudiées. Mais il nous a sem-

blé plus intéressant d'envisager l'action de ces enzymes sur les cristaux intacts, pour les raisons suivantes : au cours de l'intoxication des Piérides par *B. thuringiensis*, le processus naturel met en jeu l'hydrolyse enzymatique des cristaux à l'état natif, d'autre part, l'action des protéases de *Pieris* sur un substrat aussi complexe est un cas particulier de protéolyse présentant un certain intérêt théorique, enfin il était intéressant d'étudier la libération et la répartition du motif toxique entre les différents constituants de l'hydrolysat.

Au cours de l'étude des propriétés des protéases, nous avons montré que la lyse enzymatique des cristaux était soumise aux mêmes facteurs que la digestion des protéines par ces enzymes ; il s'agit bien d'une protéolyse et non d'une réaction secondaire de réduction ou d'alcalinisation du milieu. Nous avons centré cette étude de l'hydrolyse enzymatique des cristaux par les protéases de *Pieris* sur deux objectifs principaux :

— la mise en évidence du rôle de la spécificité des enzymes par la caractérisation des groupements terminaux, et spécialement des groupes COO^- terminaux, de différentes fractions résultant de la protéolyse.

— la recherche de la libération du motif toxique (responsable de la toxicité vraie) et sa répartition entre les différents constituants de l'hydrolysat, principalement parmi les plus petits peptides.

Tout d'abord nous décrirons le phénomène de lyse, puis les conditions quantitatives de la réaction avant d'envisager l'analyse des constituants de l'hydrolysat.

1. — Examen microscopique d'une préparation en cours de lyse

Lorsqu'une suspension de cristaux de la souche Berliner est mise en présence de chyle brut de *Pieris*, c'est-à-dire dans les conditions d'action *in vivo*, l'examen de la préparation, au microscope à contraste de phases, permet d'observer les faits suivants (déjà signalés par Martouret en 1961) (113) :

— perte de réfringence des cristaux dans les premières minutes.

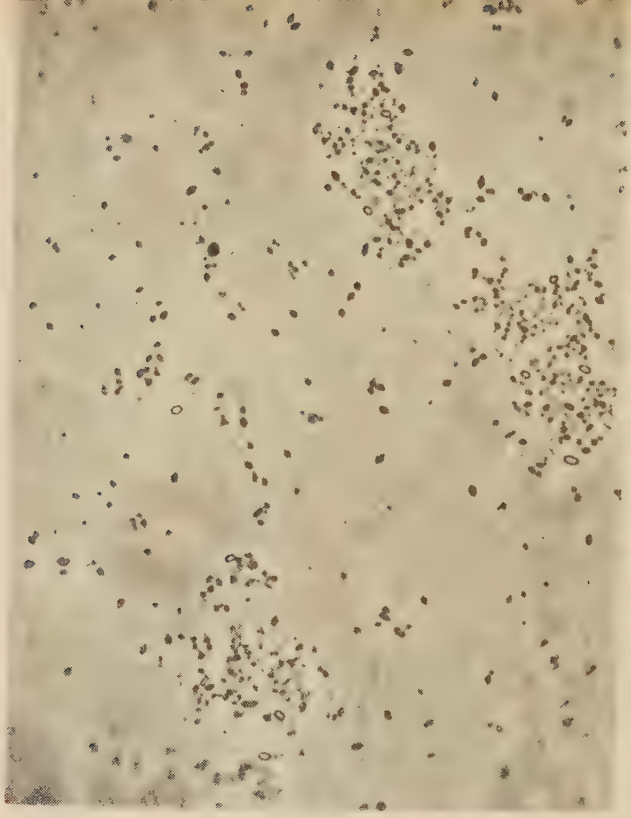
— changements morphologiques de l'inclusion se traduisant, soit par un gonflement, soit par une distorsion de la structure cristalline, aboutissant finalement à la dispersion des constituants.

Ces phénomènes se produisent dans les trente minutes suivant l'addition du chyle. L'évolution de la dissolution peut être suivie par examen direct, avec un dispositif en goutte pendante.

L'incubation de suspensions de cristaux avec des préparations partiellement purifiées des enzymes de *Pieris*, en milieu tamponné à pH 9,5, donne lieu à l'observation des mêmes phénomènes, si l'on effectue des prélèvements à des temps variables.

Dans les premières 30 minutes, l'aspect de la préparation est assez composite : on y trouve un mélange de cristaux intacts, de cristaux ayant perdu leur réfringence et prenant l'aspect de « fantômes », de formes distordues et de structures en voie de dispersion (figure 46 b). Après 2 heures d'incubation, la totalité des cristaux ont perdu leur structure et l'on ne voit plus que des débris et des amas informes (46 c et d). La rupture des liaisons peptidiques par l'action des protéases provoque la désorganisation de la structure, dont la disparition est progressive, pour aboutir finalement à la dispersion des constituants. Les premières manifestations du phénomène de lyse se traduisent par une chute de l'opacité des suspensions qui peut être suivie quantitativement et qui permet d'estimer le degré de dissolution d'une préparation. La dispersion de la structure des inclusions est accompagnée de la libération de protéines solubles qui sont dosables dans les surnageants, après centrifugation des préparations.

[a]



[b]

[c]

[d]

Figure 46.

Evolution de la lyse enzymatique d'une suspension de cristaux par les protéases de Pieris.
La réaction est suivie par l'examen au microscope à contraste de phase.

a) *Aspect de la préparation au temps* 0.

b), c) *et* d) *Aspect de la préparation après* 30 *minutes,* 2 *heures et* 5 *heures d'hydrolyse.*

Notons, pour terminer, que l'aspect de la dissolution enzymatique est variable selon les souches dont les critaux sont issus : pour la souche Anduze par exemple, la perte de la réfringence est pratiquement inexistante, par contre on observe la disparition de la structure cristalline, disparition se manifestant par l'érosion des inclusions qui deviennent de plus en plus petites. Ces diffé-

Tableau XXIII

Hydrolyse des cristaux de la souche Berliner par une préparation enzymatique de Pieris (Stade II) en fonction du temps, du pH et de la température de l'expérience

Temps d'incubation	pH 9,5						pH 10,5					
	30°			37°			30°			37°		
	Chute d'opacité p. 100	Protéines mg/ml (1)	Ninh. µM/ml (2)	Chute d'opacité p. 100	Protéines mg/ml	Ninh. µM/ml	Chute d'opacité p. 100	Protéines mg/ml	Ninh. µM/ml	Chute d'opacité p. 100	Protéines mg/ml	Ninh. µM/ml
30 minutes .	69	2,85	1,25	67	2,9	1,9	88	4,45	2,55	87	4,3	2,75
2 heures ..	88	4,35	2,25	91	4,5	2,45	95	4,65	2,55	95	4,8	2,85
4 heures ..	91	4,45	2,9	92	4,5	3,2	95	4,8	3,5	95	4,8	3,1
6 heures ..	91	4,5	3,2	92	4,6	3,2	98	4,8	3,5	95	4,9	3,2
24 heures ..	91	4,5	3,2	92	4,6	3,2	98	4,8	3,5	98	4,9	3,5

(1) Le dosage des protéines (méthode de Lowry) est effectué sur les surnageants des différents prélèvements, préalablement centrifugés.

(2) La libération de produits d'hydrolyse réagissant à la ninhydrine est exprimée en équivalents NH_2 (µMoles) libérées par ml dans ces mêmes surnageants.

rences, déjà visibles au microscope optique, traduisent certainement des différences au niveau de la structure tertiaire et peut être au niveau de la structure primaire de la protéine.

2. — **Etude quantitative de la lyse enzymatique**

Bien que chacune des protéases de *Pieris* possède la propriété de solubiliser les cristaux, nous envisagerons ici, l'hydrolyse par des préparations contenant les deux enzymes.

Nous cherchons en effet à expliquer le phénomène de dissolution, tel qu'il a lieu *in vivo* ; dans ces conditions la dissolution résulte de l'action simultanée des deux enzymes présents dans le chyle.

Nous avons tout d'abord recherché les conditions de pH et de température permettant d'obtenir la lyse maximum et suivi quantitativement la réaction en fonction du temps d'incubation. Deux suspensions de cristaux de la souche Berliner sont préparées en tampon bicarbonate à deux pH différents : 9,5 et 10,5, à raison de 5 mg par ml. A chacune de ces suspensions nous ajoutons la préparation enzymatique (stade II) à la concentration finale de 100 µg par ml, soit un rapport enzyme/substrat de 1/50, généralement utilisé pour les protéolyses. Des quantités égales de chacune de ces préparations sont incubées : l'une à 30°, l'autre à 37°.

Des prélèvements sont effectués au cours de l'incubation, aux temps suivants : 30 minutes, 2, 4, 6 et 22 heures.

Pour chaque prélèvements, l'hydrolyse est estimée quantitativement au moyen de trois critères :

— Evolution de l'opacité des préparations, par lecture de la densité optique sur une dilution au 1/10, au photomètre Meunier, avec un filtre orange, dans une cuve de 0,2 cm de trajet optique.

— Apparition de protéines solubles dans les surnageants des préparations, par dosage de ces protéines selon la technique de Lowry.

— Libération de produits d'hydrolyse réagissant à la ninhydrine et résultant de l'attaque enzymatique des chaînes protéiques libérées par la dissolution. Cette dernière manifestation caractérise la protéolyse proprement dite et le stade terminal de la réaction. Les dosages de ninhydrine sont effectués sur les surnageants des préparations.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau XXIII. Nous pouvons en dégager les faits suivants :

1° la chute d'opacité des préparations et la libération de protéines solubles sont concomitantes et correspondent à la dissolution des éléments figurés.

2° la libération de substances positives au réactif ninhydrine continue à évoluer alors que la solubilisation des cristaux est terminée.

3° les maximum de solubilisation et de protéolyse sont respectivement du même ordre de grandeur quelles que soient les conditions de pH et de température envisagées dans l'expérience.

4° le pH auquel l'hydrolyse est effectuée intervient principalement dans les 30 premières minutes de la réaction.

5° même dans le cas où l'hydrolyse est plus lente, c'est-à-dire à pH 9,5 et 30° la réaction n'évolue plus au-delà de 6 heures.

Ces expériences ont été réalisées sur les cristaux de la souche Berliner. Or, nous avons signalé ci-dessus que l'aspect microscopique de la dissolution des cristaux de la souche Anduze se présente différemment. Cette observation est confirmée si nous suivons la lyse d'une suspension de cristaux de la souche Anduze au cours de l'hydrolyse enzymatique à pH 9,5 et 30° (tableau XXIV) ; nous

Tableau XXIV

Lyse enzymatique des cristaux de la souche Anduze par une préparation enzymatique de Pieris **Stade II**

Concentration de l'enzyme mg/ml	Chute d'opacité p. 100		
	1 h.	2 h.	3 h.
0,036	5	14	32
0,072	6	41	41
0,144	8	47	47

L'évolution de la lyse de la préparation de cristaux (3mg/ml) à pH 9,5 et à 30° est suivie en appréciant les variations d'opacité des préparations à 600 $m\mu$, en cours de réaction.

constatons en effet que la chute d'opacité dans ce cas ne dépasse pas 47 p. 100, même pour les concentrations les plus élevées d'enzyme. Dans les conditions où la lyse enzymatique est totale pour les cristaux de la souche Berliner, elle n'est que partielle pour la souche Anduze. Cette différence dans l'efficacité des protéases de *Pieris* traduit vraisemblablement des différences dans la structure des cristaux de ces deux souches et se manifeste d'ailleurs par la toxicité plus faible des cristaux de la souche Anduze (101). Nous voyons ainsi que la composition et la structure de l'inclusion conditionnent l'hydrolyse enzymatique qui, elle-même, conditionne la libération de la toxicité.

3. — Composition des lysats enzymatiques

A la suite des expériences quantitatives décrites ci-dessus pour les cristaux de la souche Berliner, nous avons choisi, pour la préparation des lysats les conditions permettant d'obtenir le maximum d'hydrolyse : les cristaux, à la concentration de 5 mg/ml sont mis en suspension dans une solution de tampon bicarbonate 0,1 M de pH 10,5, on ajoute l'EDTA (à la concentration finale 10^{-3} M) pour protéger l'enzyme ; l'hydrolyse est effectuée par une préparation enzymatique stade II, contenant donc les deux enzymes dont la concentration dans le milieu réactionnel est de 100 µg/ml, soit un rapport enzyme/substrat de 1/50. L'incubation est réalisée à 35° pendant 6 heures. La préparation est alors centrifugée, puis passée sur filtre millipore, de manière à éliminer les spores éventuellement présentes dans la suspension de cristaux.

a) Fractionnement préliminaire du lysat sur Sephadex G-75

Nous avons pu montrer que la dialyse d'un tel lysat permettait de séparer plusieurs produits d'hydrolyse (98) (39). Les fractions non dialysables et dialysables obtenues diffèrent nécessairement par le poids moléculaire de leurs constituants mais présentent toutes deux la toxicité par injection.

Après 18 heures de dialyse, par exemple, la répartition de ces différentes fractions est la suivante :

Pour 10 mg de lysat :
— fraction non dialysable : 6,7 mg de protéines,
— fraction dialysable : 3,1 mg de protéines.

La présence, dans la fraction dialysable, de substances réagissant avec le réactif de Folin indiquait la libération de fragments assez gros dont le passage à travers la membrane de dialyse est difficile à suivre de façon quantitative.

Nous avons préféré utiliser pour le fractionnement de l'hydrolysat (fractionnement préliminaire) une technique de chromatographie sur colonne de Sephadex G-75. La chromatographie sur Sephadex permet en effet de réaliser le fractionnement d'un mélange complexe de constituants en plusieurs groupes, différant par leur poids moléculaire.

Une préparation correspondant à l'hydrolyse de 350 mg de cristaux est passée sur une colonne de Sephadex G-75 de $3{,}5 \times 75$ cm, équilibrée avec une solution de collidine à 1 p. 100 de pH 8,0. L'élution est réalisée par ce même tampon et le volume des fractions est de 7,5 ml.

Dans ces conditions, nous recueillons en début d'élution (figure 47) un pic de protéines exclues du gel, donc constituées théoriquement par des substances de poids moléculaire supérieur à 40 000. Nous éluons ensuite un groupe de substances retenues sur le gel, et dont certaines fractions réagissent fortement avec

le réactif à la ninhydrine et doivent donc correspondre à de plus petites molécules. Ce groupe de substances qui nous a semblé particulièrement intéressant fera l'objet d'une étude plus approfondie.

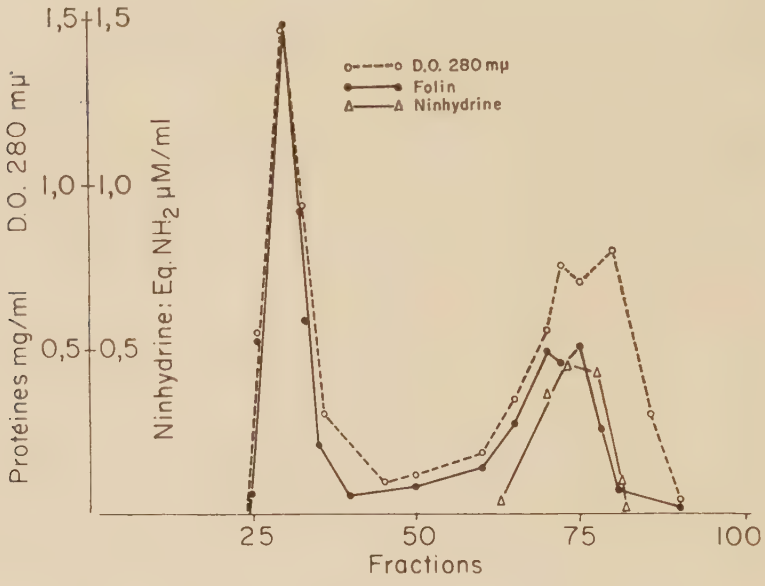


Figure 47.

Fractionnement préliminaire d'un lysat enzymatique de cristaux sur colonne de Sephadex G-75.
Charge : 350 mg de protéines - colonne de 3,5 × 75 cm.
Volume des fractions : 7,5 ml.

Ce fractionnement préliminaire sur Sephadex montre déjà l'hétérogénéité des produits de l'hydrolyse : molécules protéiques, peptides de taille variable et, nous le verrons plus loin, acides aminés libres. La présence de protéines de poids moléculaire assez élevé dans ce lysat résulte évidemment de la nature de ce substrat dont la dégradation totale ne peut être réalisée en une seule réaction enzymatique.

b) Répartition des différents produits en fonction du degré d'hydrolyse

Ces résultats de fractionnement sur Sephadex ont été obtenus avec un lysat préparé dans les conditions optimum d'hydrolyse. Nous avons vu que la vitesse de la réaction enzymatique varie selon les conditions de pH ou de température à laquelle elle est réalisée.

On peut se demander comment se répartissent ces différents groupes de substances en fonction du degré d'hydrolyse. De plus, étant donné le pH alcalin de 10,5 auquel est effectué la lyse, on pourrait se demander si l'hydrolyse enzymatique n'est pas accompagnée d'une hydrolyse alcaline expliquant l'hétérogénéité des produits libérés.

En réponse à cette question que nous nous sommes posée, nous avons pu vérifier les faits suivants :

1° Lorsque nous effectuons l'hydrolyse à un pH inférieur à 10,5 à pH 9,5 par exemple, la composition des lysats est toujours la même : après séparation sur colonne de Sephadex 75, nous retrouvons deux groupes de constituants.

2° La répartition de ces deux groupes de constituants est fonction du degré d'hydrolyse, donc du temps d'incubation. Soit un lysat enzymatique de cristaux, à la concentration initiale de 4 mg/ml, en tampon bicarbonate 0,1 M de pH 9,5 : si nous effectuons la séparation de ce lysat sur colonne de Sephadex 75 aux temps suivants d'hydrolyse : 2, 4, 6 et 22 heures, nous remarquons (figure 48) que le pic 2 correspondant au groupe peptique s'accroît

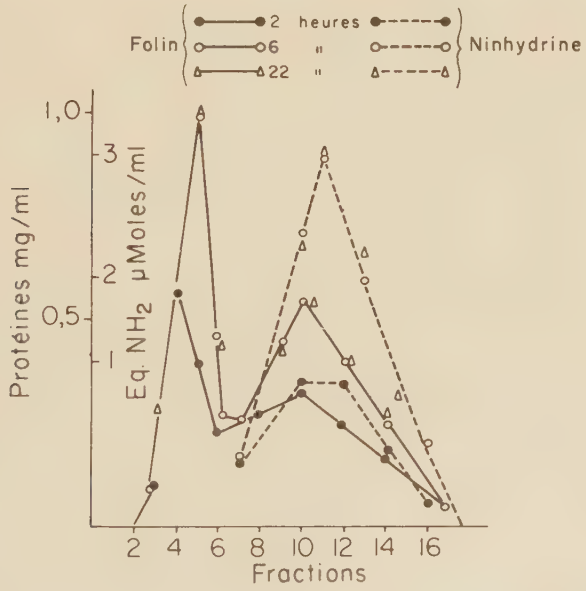


Figure 48.

Répartition des différentes fractions d'un lysat enzymatique des cristaux en fonction du temps d'hydrolyse.

Le fractionnement est réalisé sur colonne de Sephadex G-75 de 1,2×15 *cm. Volume des fractions :* 1 *ml. Charge :* 8 *mg de protéines.*

en fonction du temps de lyse, pour atteindre un maximum à 6 heures. On observe l'accroissement correspondant de la réactivité à la ninhydrine qui traduit le degré de protéolyse des chaînes protéiques libérées par la dissolution.

3° L'hydrolyse alcaline dans NaOH 0,05 N à pH 12,0, libère seulement une fraction protéique. Après séparation sur Sephadex 75 (figure 49) nous obtenons un seul pic de protéines, exclu du gel.

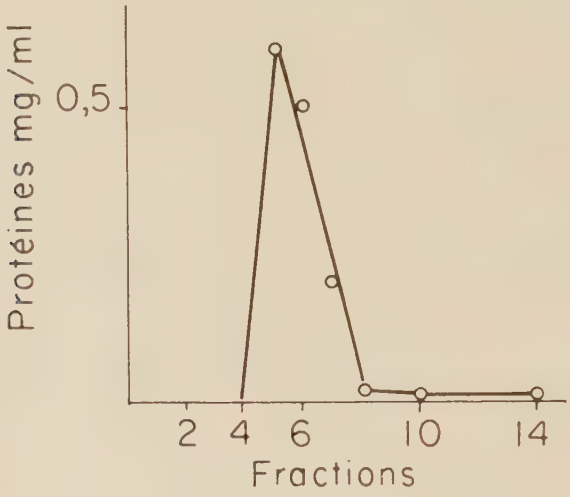


Figure 49.

Fractionnement sur Sephadex G-75 d'une préparation résultant de la dissolution des cristaux par la soude 0,05 N.

Colonne de 1,2×15 cm. Volume des fractions : 1 ml. Charge : 5 mg de protéine.

c) Composition de la partie protéique du lysat

Le premier groupe de substances séparées par la chromatographie sur Sephadex 75 correspond théoriquement à des protéines de poids moléculaire supérieur à 40 000. Nous avons cherché à déterminer le nombre de ces constituants qui ont résisté à l'hydrolyse enzymatique :

— Par électrophorèse sur gel d'amidon à l'urée, à pH 8,6, nous pouvons remarquer (figure 50) la présence d'au moins six constituants, quatre d'entre eux migrant vers l'anode.

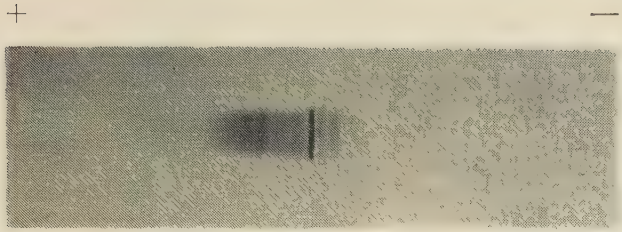


Figure 50.

Electrophorèse sur gel d'amidon de la fraction protéique du lysat enzymatique de cristaux. Gel à l'urée 6 M de pH 8,6. 18 heures. 5 volts/cm.

— Nous avons effectué la détermination des groupements NH^2 terminaux par la technique de Sanger. La chromatographie dans le système phtalate-alcool amylique tertiaire et dans les deux systèmes associés : toluène et phosphate 1,5 M, nous a permis d'identifier les acides aminés suivants : DNP-Glu, DNP-Asp, DNP-Ala, DNP-Phe, DNP-Tyr et DNP-Gly, soit au total six groupes NH_2 terminaux. Nous ne chercherons pas ici la correspondance avec la spécificité des protéases, puisque l'hydrolyse se fait préférentiellement au niveau des acides aminés de l'extrémité carboxylique.

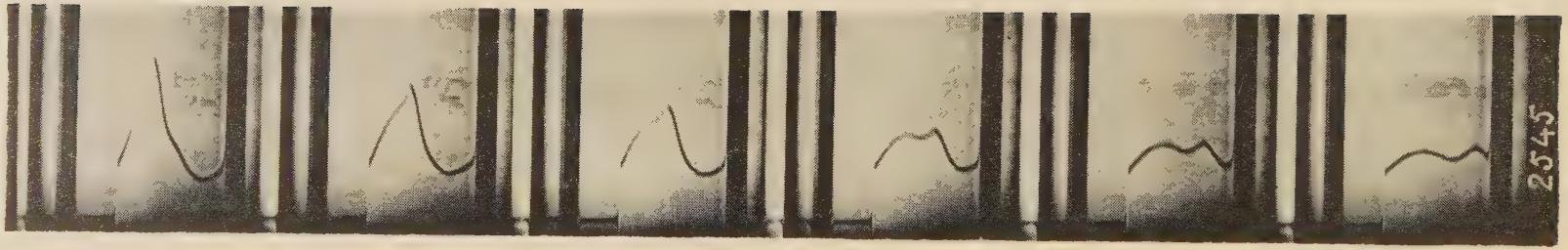
— Enfin, cette même préparation, amenée à la concentration de 9 mg/ml et au pH 10,5 où elle est parfaitement soluble, est soumise à l'ultracentrifugation. L'analyse révèle (figure 51 I) : un constituant principal, dont la constante de sédimentation à 20° est **s = 4,0** (soit un poids moléculaire de l'ordre de 50 000) et qui constitue 42 p. 100 de la préparation et un groupe de substances, dont la constante de sédimentation est **s = 0,993** (soit un poids moléculaire de l'ordre de 13 000).

Ainsi les résultats donnés par l'électrophorèse, l'analyse des groupes NH_2 terminaux et l'ultracentrifugation sont concordants et suggèrent l'existence de plusieurs fractions protéiques (vraisemblablement 6) dans cette partie du lysat enzymatique.

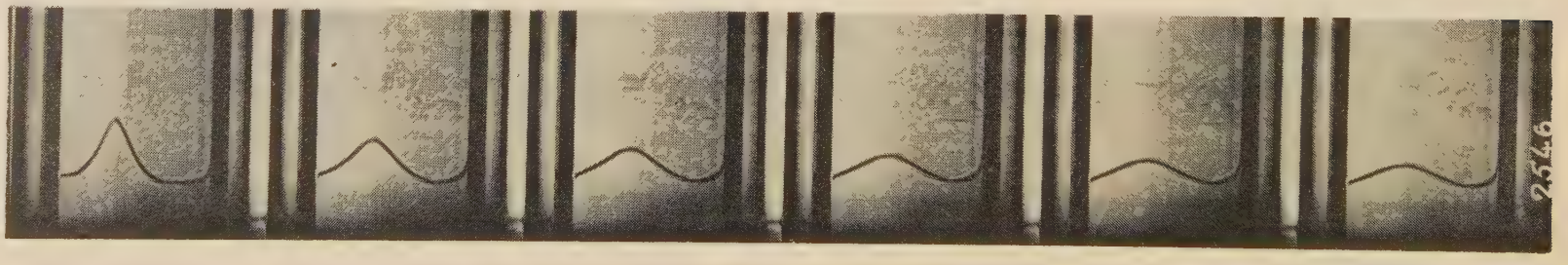
d) Composition de la partie peptidique du lysat

Nous nous sommes particulièrement intéressée à ce groupe de constituants du lysat dans l'optique que nous avons précédemment indiquée, à savoir : l'identification de l'extrémité carboxylique des peptides et l'isolement des plus petites fractions portant encore le motif toxique.

Cette partie du lysat, incluse en Sephadex 75, peut correspondre à des protéines de poids moléculaire inférieur à 40 000 ou à des peptides. D'autre part, la forte réactivité à la ninhydrine



I : *Fraction protéique du lysat, aux temps :* 2, 10, 18, 34 *et* 50 *mn,*



II : *Fraction peptique du lysat, aux temps :* 2, 18, 34, 50 *et* 58 *mn.*

Figure 51.

Diagrammes d'ultracentrifugation
de différentes fractions d'un lysat enzymatique de cristaux.

des fractions 70 à 80 (figure 47) permet de supposer que nous avons des petits peptides ou des acides aminés libres dans cette partie de l'hydrolysat.

L'ensemble des fractions de ce groupe réunies et amenées à la concentration de 10 mg de protéines par ml a été soumis à une analyse d'ultracentrifugation. Cette expérience a permis de mettre en évidence la présence d'un seul pic de sédimentation, pic hétérogène dont la constante **s à 20°** a pour valeur **0,41** (figure 51 II). Nous pouvons conclure à l'existence de un ou plusieurs peptides dont le poids moléculaire est de l'ordre de **5 000.**

Ces mêmes fractions examinées en chromatographie unidimensionnelle manifestent, après révélation à la ninhydine 0,2 p. 100, la présence de molécules plus petites correspondant à de courts peptides et à des acides aminés libres (figure 53, FP) que nous avons pu identifier au moyen de différents témoins (il s'agit de : leucine, valine, phénylalanine, tyrosine, alanine arginine et lysine).

L'identification des acides aminés libres, difficile par chromatographie sur papier à cause de la présence des peptides, a été confirmée au moyen de la technique automatique d'analyse des acides aminés précédemment citée. (124) (134)

— *Chromatographie de ces fractions sur Sephadex G-25.*

L'hétérogénéité de cette partie peptidique du lysat nous a fait envisager un fractionnement préliminaire sur Sephadex G-25, afin de séparer les plus gros peptides des autres produits d'hydrolyse.

Pour ce faire, nous avons réalisé la chromatographie de 100 mg de cette préparation sur une colonne de 1 cm × 160 cm équilibrée à pH 8,0 avec une solution de collidine à 1 p. 100, utilisée pour l'élution qui est effectuée à 35° ; les dosages de protéines et de ninhydrine sont exécutés sur 0,1 ml des différentes fractions.

Pour déterminer le volume d'exclusion de cette colonne, nous avons fait passer, avant l'expérience, une solution de bleu dextrane 2000, colorant de haut poids moléculaire exclu de tous les Sephadex.

Les résultats de la chromatographie sont donnés par la figure 52. Nous pouvons remarquer les faits suivants :

1° l'ensemble des fractions est positif au réactif de Folin et présente trois maxima.

2° les premières fractions commencent à sortir à la fin de l'élution du témoin coloré.

3° les fractions réagissant à la ninhydrine passent par un maximum dont l'élution suit immédiatement celle des peptides présentant une forte réactivité au Folin.

4° l'examen des différentes fractions par chromatographie sur papier permet de constater la présence de peptides faiblement positifs à la ninhydrine et l'absence d'acides aminés libres dans

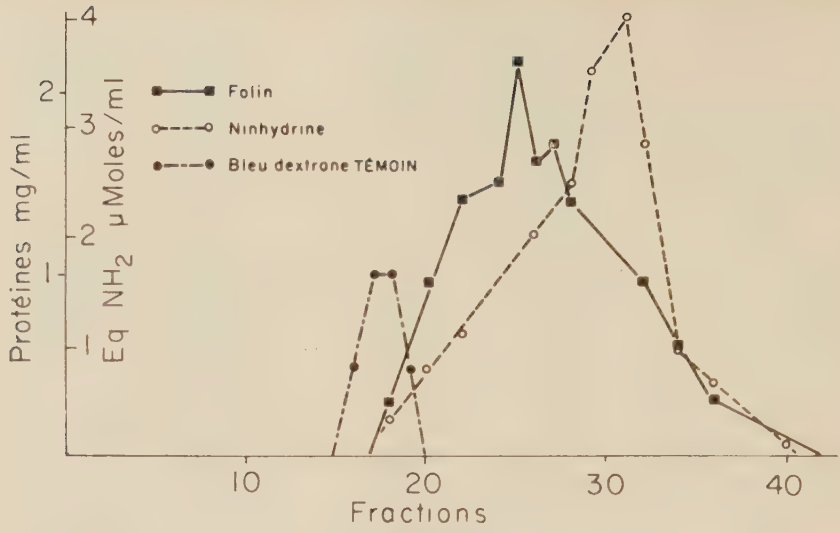


Figure 52.

Chromatographie de la partie peptidique du lysat enzymatique sur colonne de Sephadex G-25.
Charge : 100 *mg de protéine. Colonne de* 1 × 160 *cm.*
Volume des fractions : 3 *ml.*

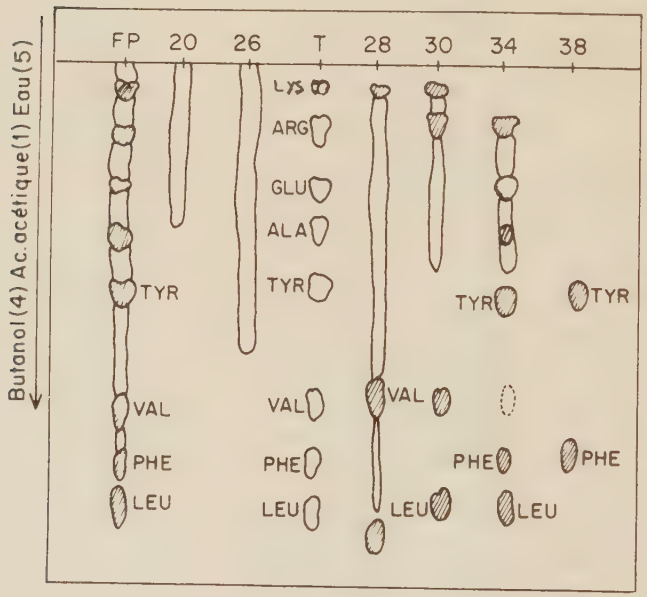


Figure 53.

Chromatographie sur papier des différentes fractions de la partie peptidique du lysat enzymatique.

— *FP : fraction peptidique totale.*
— 20, 26, 28, 30, 34 *et* 38 *: fractions résultant de la chromatographie sur colonne de Sephadex* 25.
— *T : acides aminés témoins - révélation par une solution de ninhydrine à* 0,2 *p.* 100 *dans l'acétone.*

les fractions 18 à 26 comprises, à partir de la fraction 27 nous observons des taches plus nettes correspondant à des peptides plus petits et acides aminés libres, parmi lesquels : lysine, arginine, valine, leucine et à partir de la fraction 34 : phénylalanine et tyrosine. (Figure 53.)

Par la chromatographie sur Sephadex 25, nous avons pu séparer le lysat en deux groupes principaux, l'un correspondant à de gros peptides, l'autre à des peptides plus petits et acides aminés libres.

D'autre part, cette technique présente l'avantage de donner quelques indications sur le poids moléculaire des substances à analyser. Il est en effet connu (2) (181) que les substances éluées des différents Sephadex sortent par ordre de poids moléculaire décroissant, d'où, l'application récente de ce principe pour la détermination des poids moléculaires (11). En ce qui concerne le Sephadex G-25: les substances ayant pour poids moléculaire 5 000 sont totalement exclues, entre 4 000 et 5 000 se situent les molécules qui sont à la limite de l'exclusion, les constituants plus petits sortent ensuite par ordre décroissant de poids moléculaire.

Les premières fractions de notre éluat sont à la limite de l'exclusion et correspondent alors à des peptides de poids moléculaire inférieur ou égal à **5 000.** Ce résultat et celui de l'analyse d'ultracentrifugation sont entièrement concordants et permettent d'attribuer aux plus gros peptides de cette partie du lysat, un poids moléculaire de l'ordre de **5 000.**

A la suite de cette expérience, nous avons divisé l'éluat en deux parties :

— 1) fractions 17 à 26,

— 2) fractions 27 à 40.

et réuni les fractions correspondant à chacun de ces deux groupes.

4. — Isolement de peptides et confirmation de la spécificité des protéases

Par la chromatographie sur Sephadex 25, nous avons montré la présence, dans la partie II de l'éluat, d'acides aminés libres : leucine, tyrosine, phénylalanine, alanine, arginine et lysine, dont la libération résulte de la rupture de liaisons peptidiques correspondant à la spécificité des enzymes.

Nous avons alors cherché à isoler des peptides dans la partie I du même éluat et à caractériser leurs groupements terminaux, spécialement l'extrémité carboxylique.

a) Chromatographie sur DEAE Sephadex A-25

Les fractions réunies de la partie I de l'éluat sont concentrées et soumises à une nouvelle chromatographie sur DEAE Sephadex A-25 échangeur d'anions. Pour une concentration en protéines de

30 mg, nous utilisons une colonne de 1 × 55 cm, équilibrée en tampon collidine à 1 p. 100 de pH 8,0 ; la résine et les solutions tampon sont préalablement désaérées. L'élution est réalisée au moyen d'un gradient de pH décroissant et de force ionique croissante, obtenu par addition goutte à goutte d'un tampon acétate de collidine à 5 p. 100 de pH 3,8, au tampon pH 8,0 de la chambre de mélange. L'élution est terminée par 50 ml de CH_3COOH 10 p. 100. L'expérience est réalisée à 37°.

Dans ces conditions, nous pouvons séparer quatre peptides, ou groupes de peptides, donnant une réaction positive au Folin (figure 54), dont deux existent en proportion plus importante. Ces différents peptides réagissent faiblement à la ninhydrine, nous n'avons pas observé la présence d'acides aminés libres.

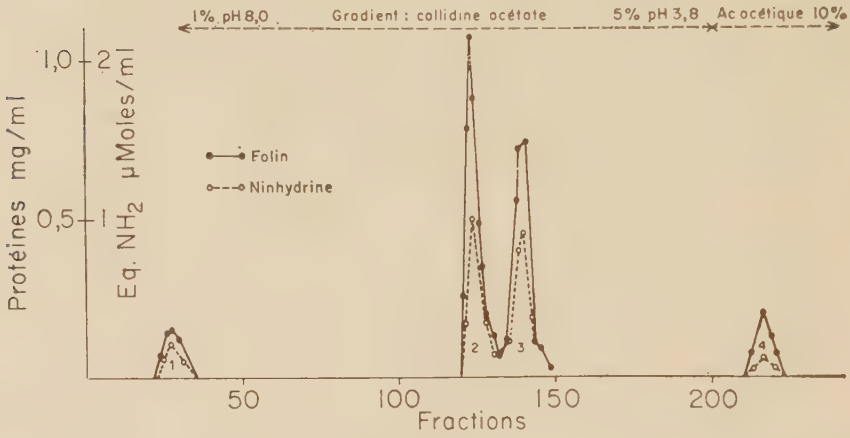


Figure 54.

Séparation des peptides du groupe I de la fraction peptidique du lysat enzymatique, sur colonne de DEAE Sephadex A-25.
Charge : 30 mg de protéines. Colonne de 1 × 55 cm.
Volume des fractions : 1,5 ml. Température : 37°.

b) Caractérisation des peptides

Nous avons tout d'abord cherché à vérifier l'homogénéité de ces peptides (principalement des peptides 2 et 3) :

— par électrophorèse sur papier,
— par l'identification du groupement NH_2 terminal.

L'électrophorèse réalisée à pH 4,5, en tampon acétate de pyridine 1 p. 100, permet d'identifier pour chaque peptide une tache révélable par la ninhydrine à 0,2 p. 100 (tache faiblement positive puisqu'il s'agit de gros peptides). La migration de ces peptides cor-

respond d'ailleurs à l'ordre de leur élution au cours de la chromatographie : (Figure 55.)

— le peptide 1 qui est le plus basique est élué à pH 8,0,
— le peptide 2 est élué vers pH 6,0,
— le peptide 3 entre pH 5 et pH 4,0,
— le peptide 4, plus acide, est élué entre pH 3 et pH 2,0.

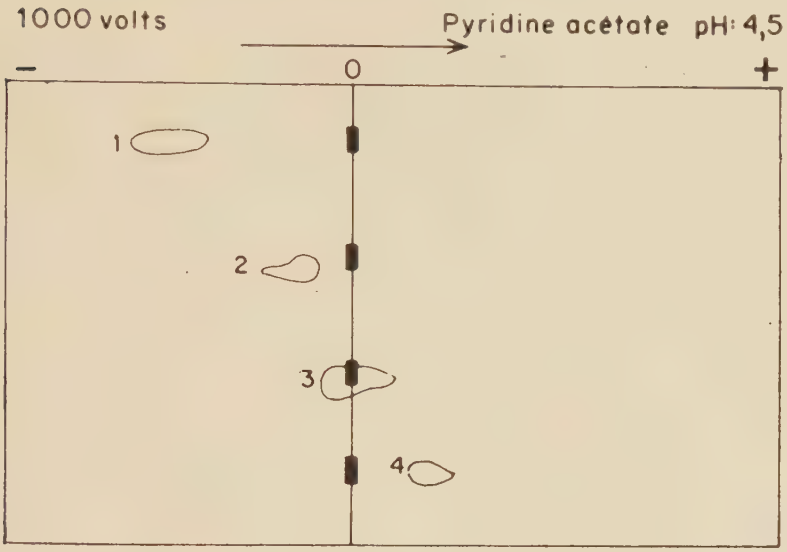


Figure 55.

Electrophorèse sur papier des peptides isolés par la chromatographie sur colonne de DEAE Sephadex A-25. Durée : 2 heures 30. Révélation par une solution de ninhydrine à 0,2 p. 100 dans l'acétone.

Il semble donc que chacun de ces pics corresponde à un seul peptide, ces peptides ont des points isoélectriques différents.

Nous avons effectué l'analyse du groupe NH_2 terminal, seulement pour les peptides 2 et 3. Par la chromatographie dans le solvant phtalate saturé d'alcool amylique tertiaire, nous avons identifié pour ces deux peptides un seul acide aminé terminal, il s'agit dans les deux cas du DNP aspartique avec, dans le peptide 2, des traces d'alanine.

Nous avons alors analysé l'extrémité C terminale de ces peptides au moyen de la carboxypeptidase. Chacun des peptides (1 mg) est soumis à l'action de 50 µg de carboxypeptidase A et des prélèvements sont effectués en cours d'hydrolyse pour identifier les acides aminés libérés.

L'identification de l'acide aminé C terminal est évidemment assez délicate puisque l'hydrolyse procède par récurrence et que nous avons en fin de réaction plusieurs acides aminés par peptide. Cependant, les observations recueillies sur des prélèvements effectués en début d'hydrolyse (20 minutes) nous permettent de reconnaître pour les peptides 2 et 3 : la leucine terminale, pour les peptides 1 et 4 : l'alanine terminale.

c) Conclusions relatives à la spécificité des protéases

L'analyse de la fraction peptidique nous a permis de connaître, du moins partiellement, la composition de cette partie de l'hydrolysat : elle est constituée par des peptides dont le poids moléculaire maximum est 5 000 (vraisemblablement quatre peptides), par des peptides plus petits et par des acides aminés libres. L'isolement de quatre peptides et l'identification des acides aminés libres nous ont permis de vérifier la correspondance entre la spécificité des protéases de *Pieris* (spécificité concernant l'extrémité carboxylique des acides aminés considérés) et la nature des liaisons hydrolysées au cours de la dissolution enzymatique du cristal (tableau XXV).

Tableau XXV

Spécificité des protéases et nature des liaisons rompues au cours de l'hydrolyse du cristal

	Spécificité des Enzymes *Pieris* : 1	2	Extrémité C terminale Fractions peptidiques groupe I (*) 1	2	3	4	Acides aminés lib Fractions peptidiq groupe II
ucine	++	+		+	+		+
anine	+	+	+			+	+
énylalanine ..	++						+
rosine	++						+
line	?						+
ginine		++					+
sine		+					+

(*) Les groupes I et II correspondant aux différentes fractions résultant de la chromatographie sur colonne de Séphadex G-25, de la partie peptidique du lysat enzymatique.

Dans le cas des peptides, l'hydrolyse de liaisons leucine et alanine peut correspondre indifféremment à l'un ou l'autre des enzymes. La présence des acides aminés libres est la conséquence de la spécificité des protéases, mais aussi de l'emplacement relatif

des acides aminés dans la chaîne protéique, puisque la libération d'un acide aminé implique la rupture de deux liaisons peptidiques voisines.

Nous avons pu mettre en évidence par cette étude des lysats enzymatiques le rôle joué par la spécificité des enzymes dans l'hydrolyse du cristal. Il est de plus intéressant de constater la diversité des produits d'hydolyse constitués par des protéines, peptides et acides aminés.

5. — Toxicité des différentes fractions du lysat enzymatique

L'une des caractéristiques de l'hydrolyse enzymatique est de transformer le cristal, protoxine active seulement *per os*, en toxine vraie, directement active par injection dans la cavité hémocélique.

Les premières observations recueillies à ce sujet par Martouret et nous-même (114) (98) ont d'ailleurs orienté ce travail à son début. Nous avons plus spécialement suivi l'apparition de la toxicité dans les lysats, au cours de la réaction enzymatique.

L'estimation de la toxicité des préparations est faite selon la technique décrite au chapitre I ; les deux critères retenus étant : la réduction de consommation et la mortalité. L'intoxication des Pierides au 5^{e} âge larvaire est provoquée par l'administration de 5µl de préparation de deux manières différentes : par ingestion forcée et par injection dans la cavité hémocélique.

a) Toxicité comparée des fractions protéiques et peptidiques du lysat enzymatique

Dans une première série d'expériences, nous avons envisagé l'action des deux groupes de constituants du lysat :

— le groupe protéique non dialysable et exclu du Sephadex G-75,

— le groupe peptique, dialysable, inclus en Sephadex G-75.

Ces différentes préparations sont amenées à pH 8,0 et leur action est comparée à celle d'une solution alcaline de cristaux.

La toxicité est examinée sur des lots de 10 chenilles traitées par chacune des préparations, par comparaison à un lot de chenilles traitées par l'eau stérile.

Rappelons que la réduction de consommation est calculée de la manière suivante :

$$RC = 100 - \frac{100 \times \text{surface consommée par lot traité}}{\text{S consommée par lot témoin}}$$

Nous avons rassemblé dans le tableau XXVI les résultats des dosages effectués sur les différentes préparations et nous constatons les faits suivants :

1° Les fractions protéiques et peptidiques du lysat enzymatique sont toxiques par injection, aussi bien que par ingestion.

Tableau XXVI

Toxicité comparée des fractions protéiques et peptidiques des lysats enzymatiques

	Concentration protéines mg/ml	Quantités injectées dans 5 µl	Quantités injectées µg/g larve	Ingestion forcée				Injection			
				R.C. (*) p. 100	Mortalités 3e j	5e j	10e j	R.C. p. 100	Mortalités 3e j	5e j	
ractions protéiques non dialysables exclues du Séphadex 75	1,7	8,5	42,5	99	7	10	10	96	10	10	
dilution 1/10e	0,17	0,85	4,25	99	5	7	10	82	6	7	
dilution 1/100e	0,017	0,085	0,425	85	2	9	9	35	1	3	
dilution 1/500e	0,0035	0,015	0,075	26	3	4	6	24	6	9	
ractions peptidiques dialysables incluses en Séphadex 75 :											
non diluées	1,7	8,5	42,5	97	8	10	10	98	10	10	
dilution 1/10e	0,17	0,85	4,25	97	8	10	10	97	10	10	
dilution 1/50e	0,034	0,170	0,825	96	8	10	10	98	8	10	
emoins : ssolution par NaOH 0,05 N	1,66	8,3	41,5	100	8	10	10	0	2	3	
rnageant cristaux incubés en tampon bicarbonate pH 9,5	0			0	0	0	0	0	0	0	
yle régurgité				0	0	0	0	0	0	0	
éparation enzymatique stade II	0,100			0	0	00	0	0	0	0	

(*) R.C. : réduction de consommation.

2° La dissolution alcaline des cristaux par NaOH 0,05 N est seulement toxique par voie orale.

3° Le chyle ou la préparation enzymatique partiellement purifiée, administrée aux chenilles dans les conditions de concentration où elles sont utilisées pour la préparation des lysats, ne présentent aucune toxicité.

4° Les doses toxiques sont très faibles, inférieures au µg/g de larve ; avec 0,075 µg/g de larve, nous obtenons encore 25 p. 100 de réduction de consommation.

Le principal critère de toxicité, dans le cas de la Piéride, est

évidemment la réduction de consommation, cependant les mortalités sont toujours concomitantes. Malgré l'incertitude que présentent généralement les dosages biologiques, nous obtenons une approximation satisfaisante des doses toxiques.

Il résulte clairement de ces résultats que l'hydrolyse enzymatique libère des substances hautement toxiques par injection et que le motif toxique est porté par des molécules de tailles différentes.

b) Action de la température sur la toxicité

Dans une deuxième série d'expériences nous avons évalué la toxicité des mêmes préparations, après les avoir soumises à différentes températures : 70, 80 et 90°, pendant 10 minutes ; le tableau XXVII nous donne les toxicités résiduelles :

— les fractions protéiques sont légèrement inactivées à 70°,

Tableau XXVII

Thermorésistance des fractions toxiques

	Quantités injectées µg/larve	Ingestion forcée				Injection			
		R.C. (*) p. 100	Mortalités 3e j	5e j	10e j	R.C. p. 100	Mortalités 3e j	5e j	10e j
ractions protéiques non dialysables exclues du Séphadex 75	0,825								
— non chauffée		99	7	10	10	82	10	10	10
— 70° 10 minutes ..		90	3	6	8	69	0	6	6
— 80° 10 minutes ..		66	3	4	5	46	3	4	7
— 90° 10 minutes ..		12	0	0	1	0	0	1	1
ractions peptidiques dialysables, incluses en Séphadex 75 ..	0,825								
— non chauffée		96	8	10	10	98	8	10	10
— 70° 10 minutes ..		99	9	10	10	99	9	10	10
— 80° 10 minutes ..		97	5	10	10	97	9	10	10
— 90° 10 minutes ..	42,5	57	2	4	7	48	2	6	9
	0,825	18	0	3	6	9	1	1	2

(*) R.C. : réduction de consommation.

mais deviennent pratiquement inactives, après chauffage à 90°.

— par contre la fraction peptique, lorsque la dose administrée est la même que celle de la fraction protéique est encore

totalement active à 80°, mais perd la plus grande partie de son pouvoir toxique après chauffage à 90°. Ces dernières fractions sont sensiblement plus résistantes à la chaleur que les fractions protéiques dont la dénaturation est toujours plus facile.

c) Estimation quantitative de la toxicité de la fraction protéique

Enfin, nous avons cherché à préciser la notion de dose toxique et à déterminer la D 50, c'est-à-dire la dose provoquant 50 p. 100 des manifestations toxiques. Pour ce faire, nous avons représenté quantitativement la réduction de consommation, en fonction des doses administrées (figure 56 a).

Dans ce graphique, nous avons représenté la seule toxicité par ingestion des préparations de cristaux et la toxicité de la fraction protéique du lysat enzymatique qui manifeste la même efficacité que l'inclusion parasporale.

Dans la figure 56 b, nous avons représenté la seule toxicité par injection de la fraction protéique du lysat (les cristaux sont inactifs par cette voie) ; toxicité tout à fait comparable d'ailleurs à celle qui est manifestée par ingestion.

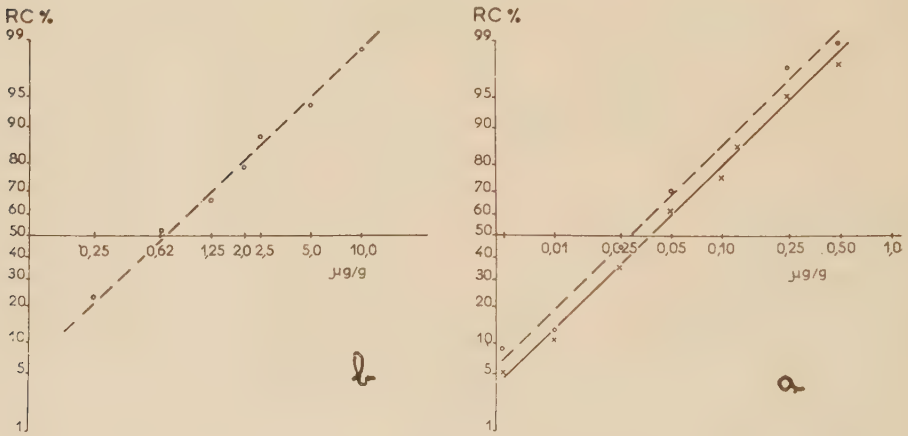


Figure 56.

Toxicité comparée des cristaux et de la fraction protéique du lysat enzymatique.

a) *par ingestion forcée,*

b) *par injection.*

En abscisses : doses administrées aux larves, exprimées en µg/g.

En ordonnées : réduction de consommation, exprimée en p. 100.

x——x : *suspension de cristaux.*

o - - - o : *fraction protéique du lysat enzymatique.*

Ces graphiques nous permettent de déterminer pour la D 50 les valeurs suivantes :

— 0,03 µg/g de larve pour la préparation de cristaux.
— 0,04 µg/g de larve pour la toxine soluble administrée par ingestion.
— 0,62 µg/g de larve pour cette dernière préparation, lorsqu'elle est administrée par injection.

Dans ce dernier cas, la D 50 est dix fois plus élevée mais reste quand même inférieure au µg/g de larve.

d) **Toxicité comparée des peptides isolés et de la fraction peptidique globale**

L'une des raisons qui nous ont incitée à isoler les peptides résultant de l'hydrolyse enzymatique était, nous l'avons signalé, la recherche du plus petit peptide portant encore le motif toxique.

Nous avons soumis les peptides isolés à la suite de la chromatographie sur DEAE Sephadex aux mêmes tests de toxicité.

Dans ce cas, les doses administrées aux larves sont supérieures au µg/g d'animal-test. Nous constatons (tableau XXVIII) la toxicité

Tableau XXVIII

Toxicité comparée des peptides isolés et de la fraction peptidique globale

	Quantités injectées µg/g larve	Réduction de consommation	
		Ingestion forcée	Injection
a) Peptides : 1	4	21	8
2	12	20	22
3	10	35	24
4	3	11	8
b) Fraction peptidique totale conservée à 25° ..	17,5	48	41
c) Fraction peptidique totale	42,5	97	98
conservée à — 10°	0,825	96	98

faible de chacun de ces peptides, toxicité très inférieure à celle de la fraction peptidique globale. Ces résultats pourraient être dus au fait que, parmi les constituants de cette fraction, les peptides isolés ne sont pas les plus toxiques. Cependant, nous devons pré-

ciser que les diverses chromatographies aboutissant à l'isolement de ces peptides ont été effectuées à 35°, il est possible que dans ces conditions une dénaturation se soit produite avec pour conséquence la diminution de la toxicité. Si nous comparons la toxicité d'une fraction peptidique globale maintenue à 4° pendant la chromatographie sur Sephadex 75 et conservée ensuite à — 10°, à la toxicité de la même fraction après chromatographie et conservation à 25°, nous observons dans ce dernier cas une diminution considérable de la toxicité, qui devient du même ordre de grandeur que celle des peptides isolés (tableau XXVIII).

De ce fait, la diminution de la toxicité par dénaturation (déjà suggérée par l'action de la température : tableau XXVII) survenant au cours de l'isolement des peptides, semble indiquer que la présence d'une structure est nécessaire à l'efficacité du motif toxique.

Ces diverses considérations nous permettent de penser que les peptides isolés et spécialement les peptides 2 et 3 sont toxiques aussi bien par ingestion que par injection. Par conséquent l'hydrolyse enzymatique démasque le motif toxique, qui peut être porté aussi bien par les protéines que par les peptides (dont le poids moléculaire est de l'ordre de 5 000) résultant de la protéolyse.

e) Toxicité des produits résultant de la réduction des cristaux

La transformation du cristal de *B. thuringiensis* protoxine, en toxine vraie sous l'action des protéases de *Pieris* est l'une des causes principales de l'intérêt que nous avons porté à cette question. Cependant, la protéolyse n'est pas la seule voie permettant de réaliser l'activation du cristal. Nous avons pu montrer que la dissolution des cristaux résultant de l'action des réducteurs de liaisons disulfure, libère la toxicité par injection. La dispersion de la structure cristalline, due à la rupture des ponts disulfure, a pour résultat de démasquer le motif toxique.

C'est ainsi par exemple qu'une préparation résultant de l'action du thioglycolate et administrée aux larves par ingestion et par injection, présente une toxicité élevée pour des doses très inférieures au µg/g de larve (tableau XXIX).

Il apparaît donc que les deux procédés de dissolution des cristaux envisagés : protéolyse et réduction, en désorganisant la structure de l'inclusion, réalisent par des mécanismes différents l'activation de la protoxine.

Ce phénomène, par contre, ne se produit pas au cours de la dissolution des cristaux par la soude dont l'action non spécifique, qui se manifeste vraisemblablement au hasard, ne démasque pas le motif toxique.

Tableau XXIX

Toxicité de la préparation résultant de la dissolution des cristaux par le thioglycolate

	Quantités injectées µg/g de larve	Réduction de consommation	
		Ingestion forcée	Injection
Préparation totale	87,5	99	97
	8,75	99	86
	0,875	99	73
	0,0875	99	44

La préparation contenant l'ensemble des produits de réduction est obtenue après action d'une solution de thioglycolate 0,1 M sur une préparation de cristaux à pH 9,5.

C. — ACTION DES ENZYMES PROTÉOLYTIQUES CONNUS SUR LE CRISTAL

Au cours de l'étude de la spécificité des enzymes de *Pieris*, nous avons comparé leur action à celle des protéases gastro-intestinales des animaux supérieurs, et nous avons pu montrer leur efficacité, dans les conditions où trypsine et chymotrypsine ne réalisent aucune hydrolyse. C'est pourquoi nous aimerions envisager l'action des enzymes protéolytiques les plus répandus sur les cristaux de *B. thuringiensis*.

1. — Action de la trypsine et de la chymotrypsine sur les cristaux à différents pH. Dosage de lyse

Dans une première série d'expériences, nous avons envisagé l'action de la trypsine et de la chymotrypsine sur des suspensions diluées de cristaux (170 µg/ml), à l'état natif, et suivi quantitativement la réaction par la mesure de l'opacité des préparations au cours de l'incubation.

L'action de ces enzymes est expérimentée à leur pH optimum d'activité, soit : 8,0 et à des pH plus élevés : 8,5 et 9,5. Nous avons aussi utilisé comme substrat une préparation de cristaux traitée à pH 9,5 puis ramenée à pH 8,0 avant de subir l'action des enzymes.

Les concentrations d'enzyme utilisées sont celles qui sont habituellement choisies pour le dosage de lyse des cristaux par les protéases de *Pieris*, soit 1 et 2 µg/ml pour une concentration en cristaux de 150 µg/ml. La réaction est effectuée à 30°, pendant

40 minutes, avec agitation. Aux pH 8,0 et 8,5, nous utilisons le tampon borate et à pH 9,5, le tampon bicarbonate habituellement utilisé pour les protéases de *Pieris*.

Les résultats donnés par cette expérience (tableau XXX) suggèrent les commentaires suivants :

— les deux enzymes envisagés : trypsine et chymotrypsine sont sans action sur les cristaux natifs, à leur pH optimum d'activité.

— ces mêmes enzymes sont encore sans action au pH 8,0, sur les cristaux préalablement soumis au pH alcalin de 9,5.

Tableau XXX

Action de différentes protéases sur des cristaux Berliner à plusieurs pH

Dosage de lyse

Concentration µg/ml	Chute d'opacité p. 100			
	pH 8,0	8,0 après traitement à 9,5 (1)	pH 8,5	pH 9,5
Trypsine : 1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
Chymotrypsine : 1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
Trypsine : 1	0	0	0	0
Chymotrypsine : 2	0	0	0	0
Trypsine + chymotrypsine	0	0	0	0
Pieris : 1	0	0	4,5	44
2,2	0	0	6	60

La dissolution, exprimée en chute d'opacité, est suivie par lecture directe dans les tubes d'incubation au Photomètre Meunier après 40 minutes. Concentration des cristaux 150 µg/ml.

(1) La lyse a été effectuée sur une suspension de cristaux préalablement incubée à pH 9,5 et ramenée à pH 8,0.

— les protéases de *Pieris*, aux mêmes concentrations, hydrolysent les cristaux au pH 9,5 et manifestent encore une très faible activité au pH 8,5 (bien que ce pH soit très inférieur à leur optimum d'action).

— au pH 8,5, la trypsine et la chymotrypsine qui présentent encore une activité protéolytique importante sur l'albumine dénaturée n'attaquent pas les cristaux de *B. thuringiensis*.

Cette expérience préliminaire semble indiquer que ces deux enzymes ne peuvent hydrolyser les cristaux natifs, quel que soit le pH envisagé.

2. — Action comparée de plusieurs protéases sur les cristaux natifs et dénaturés

Nous avons ensuite envisagé l'action de plusieurs protéases dans les conditions plus généralement utilisées pour l'étude de la protéolyse des préparations concentrées de cristaux. La concentration est : 2,5 mg/ml.

Les différents enzymes : trypsine, chymotrypsine, pepsine et papaïne sont expérimentés sur des préparations de cristaux n'ayant pas subi de dénaturation préalable, en l'absence et en présence d'urée 4 M, et sur des suspensions préalablement dénaturées.

a) Action de ces protéases sur les cristaux n'ayant pas subi de dénaturation préalable

Les différents enzymes précédemment cités sont mis en présence d'une suspension de cristaux seuls et d'une préparation à laquelle est ajoutée l'urée, à la concentration 4 M (à cette concentration d'urée les enzymes considérés sont encore actifs) ; la réaction est réalisée à 37°, pendant 4 heures, au pH optimum de chacune des différentes protéases. La concentration finale d'enzyme dans les différents milieux réactionnels est de 50µg/ml. La libération de protéines solubles dans ces préparations est estimée après centrifugation par dosage de Lowry dans les surnageants de prélèvements effectués après 1 heure et 4 heures de réaction.

L'action des différents enzymes sur les cristaux est comparée à celle de chacune des protéases de *Pieris ;* nous remarquons les faits suivants (tableau XXXI) :

— Sur les cristaux natifs, en l'absence d'urée : trypsine, chymotrypsine et papaïne sont totalement inactifs. La pepsine, en raison du pH 1,6 envisagé par son action, présente une activité non négligeable, cependant l'examen au microscope des cristaux dans un témoin d'incubation en HCl 0,06 N montre qu'à ce pH les inclusions sont entièrement dénaturées et se trouvent aptes à subir la lyse.

— Sur les cristaux, en présence d'urée 4 M, on n'observe pas encore d'action des trois premiers enzymes. La pepsine est toujours active mais le témoin d'incubation subit déjà une lyse importante.

— Les enzymes de *Pieris* solubilisent totalement les cristaux après 4 heures d'incubation au pH 9,5 et nous savons qu'à ce pH les cristaux seuls ne manifestent aucun changement d'aspect à l'examen au microscope.

Tableau XXXI

Action comparée de différentes protéases sur les cristaux de B. thuringiensis **sans dénaturation préalable du substrat**

	pH	Cristaux natifs				Cristaux soumis à l'action des protéases en présence d'urée 4 M			
		1 h		4 h		1 h		4 h	
		Protéines mg/ml	Chute d'opacité p. 100	Protéines mg/ml	Chute d'opacité p. 100	Protéines mg/ml	Chute d'opacité p. 100	Protéines mg/ml	Chute d'opacité p. 100
Trypsine	8,0	0,050	2	0,025	1	0,170	8	0,230	9
Chymotrypsine	8,0	0	0		0	0	0	0	0
Papaïne	7,0	0			0	0	0	0	0
Pepsine	1,6	1,07	43	1,70	68	1,53	62	1,96	79
Témoin	1,6	0,113	5	0,17	6,8	0,720	28	1,34	54
Enzymes *Pieris*									
Enzyme 1..	9,5	0,900	33	2,2	89	1,8	73	2,3	93
Enzyme 2..		1,24	52	2,25	91	1,9	76	2,4	96

Les cristaux à la concentration de 2,5 mg/ml sont agités à 37° pendant 4 heures avec chacun des enzymes dont la concentration est de 50 µg/ml de milieu de réaction. Après 1 h et 4 h les différents prélèvements sont centrifugés et les dosages de protéines sont effectués sur les surnageants.

Ces résultats confirment l'expérience préliminaire réalisée sur des préparations diluées de cristaux et montrent que les différents enzymes considérés (pepsine exceptée) ne peuvent réaliser l'hydrolyse de l'inclusion de *B. thuringiensis*. La présence d'urée dans le milieu réactionnel ne produit pas une modification de structure suffisante pour permettre l'attaque des cristaux par ces enzymes.

Les conclusions que nous avons proposées à la suite de l'étude de l'attaque des protéines natives sont applicables dans ce cas particulier de l'hydrolyse des cristaux de *B. thuringiensis*. Les conditions d'action des protéases de *Pieris*, pH optimum en

milieu alcalin, spécificité et efficacité en présence de ponts disulfure, expliquent leur action sur les suspensions de cristaux n'ayant pas subi de dénaturation préalable.

b) **Action de ces protéases sur les cristaux dénaturés**

Nous avons alors essayé l'action de ces protéases (trypsine, chymotrypsine et papaïne) sur des suspensions de cristaux après leur avoir fait subir une dénaturation selon deux procédés différents :

1° Dénaturation par l'urée 8 M : une suspension de cristaux à la concentration de 2,5 mg/ml, en tampon phosphate pH 8,0, est soumise à l'action de l'urée 8 M, pendant une heure à 30°. La suspension ainsi traitée est centrifugée puis lavée par le tampon ; des parties aliquotes de la préparation sont remises en suspension dans les solutions tampon utilisées pour l'action des différents enzymes, c'est-à-dire : phosphate pH 8,0 pour trypsine et chymotrypsine et pH 7,0 pour la papaïne.

2° Dénaturation par la chaleur : une même suspension de cristaux (2,5 mg/ml) est chauffée à 100° pendant 15 minutes ; des parties aliquotes de la préparation sont ensuite remises en suspension dans les différentes solutions tampon.

Les enzymes : trypsine, chymotrypsine et papaïne sont ajoutées aux deux préparations de cristaux dénaturés, de manière à obtenir une concentration en enzyme de 50 µg/ml. La réaction a lieu à 37°, pendant 4 h. Des prélèvements sont exécutés après 1 h et 4 h d'incubation, puis centrifugés ; on dose les protéines dans les surnageants.

A la suite des résultats expérimentaux, nous pouvons remarquer les faits suivants : (tableau XXXII)

— La dénaturation des cristaux par action de l'urée 8 M ne permet pas l'hydrolyse enzymatique par les protéases envisagées ; il s'agit sans doute d'une dénaturation réversible ou tout au moins d'une altération insuffisante de la structure de l'inclusion qui résiste encore à l'attaque enzymatique dans ces conditions.

— L'action de ces protéases n'est possible à envisager que sur les cristaux dénaturés par chauffage à 100° ; dans ces conditions, la solubilisation est quasi totale, mais on observe également une lyse importante dans les préparations témoins (cristaux incubés sans enzyme); la protéolyse est alors effectuée sur une protéine soluble, donc dans les conditions normales d'action de ces enzymes.

Il résulte de ces différentes expériences que seules les protéases de *Pieris* semblent être spécifiques de l'hydrolyse du cristal à l'état natif. Le cas de la pepsine est différent, puisque au pH 1,6 choisi pour son action, le processus de solubilisation des cristaux est déjà commencé.

Tableau XXXII

Action de la trypsine, de la chymotrypsine et de la papaïne sur les cristaux de B. thuringiensis **préalablement dénaturés**

Enzymes	Dénaturation par l'urée (1)				Dénaturation par chauffage (2)			
	1 h		4 h		1 h		4 h	
	Protéines mg/ml	Chute d'opacité p. 100	Protéines mg/ml	Chute d'opacité p. 100	Protéines mg/ml	Chute d'opacité p. 100	Protéines mg/ml	Chute d'opacité p. 100
Trypsine	0,500	20	0,675	27	1,66	66	2,25	90
Chymotrypsine	0,260	10,4	0,515	20,5	1,72	69	1,87	75
Témoin pH 8,0	0,260	10,4	0,300	12	1,54	61	2,15	87
Papaïne	0,400	16	0,430	17	1,720	69	1,700	68
Témoin pH 7,0	0,260	10,4	0,300	12	1,540	62,5	1,6	64

En (1) les cristaux, à la concentration de 2,5 mg/ml en tampon 0,02 M de pH 8,0, sont traités par l'urée 8 M pendant 1 h à 30° ; la préparation est centrifugée et le sédiment de cristaux est ensuite lavé en Tampon 0,02 M de pH 7,0, puis remis en suspension dans les solutions tampon utilisées pour l'expérience.

En (2) les cristaux (même concentration que pour 1) sont chauffés à 100° pendant 15 minutes. La préparation est centrifugée et le sédiment de cristaux est remis en suspension dans les solutions tampon utilisées pour l'expérience.

Les préparations (1) et (2) sont alors agitées à 37° pendant 4 heures en présence des différents enzymes à la concentration de 50 µg/ml. Les différents prélèvements sont centrifugés et les dosages de protéines effectués sur les surnageants.

CONCLUSIONS

Le cristal de *B. thuringiensis*, dont la structure résulte de la formation de liaisons disulfure entre les chaînes protéiques qui le constituent, réalise une structure complexe, résistant à l'action de la plupart des protéases, à l'état natif. Les protéases de *Pieris* peuvent seules attaquer l'inclusion sans dénaturation préalable, en libérant des composants de dimension variée, allant de protéines de poids moléculaire de l'ordre de 50 000 à des acides aminés libres, et nous avons pu montrer que la nature des liaisons hydrolysées correspond à la spécificité des enzymes considérés. Il s'agit d'un cas particulier de protéolyse, au cours de laquelle la

rupture des liaisons peptidiques permet la libération des groupements toxiques portés par des molécules de différentes tailles et en particulier par des peptides dont le poids moléculaire est de l'ordre de 5 000. Par cette réaction, le cristal, protoxine, se trouve transformé en toxine vraie, directement active par injection.

L'action des protéases de *Pieris* que nous avons étudiée expérimentalement, se produit vraisemblablement *in vivo,* dans le tractus digestif des Pierides intoxiquées par l'ingestion des cristaux, ce qui explique la sensibilité de ces larves aux Bacilles porteurs de l'inclusion parasporale.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Au cours de l'exposé des résultats expérimentaux, nous avons à plusieurs reprises souligné le caractère assez particulier des protéases de *Pieris*, dont les conditions d'action, différentes de celles des protéases les plus connues, rendent possible l'attaque de ce substrat non moins particulier qu'est le cristal de *B. thuringiensis*.

Nous avons purifié ces enzymes et montré dans la première partie de ce travail qu'il était impossible de dissocier l'activité protéolytique, de l'activité de lyse des cristaux de *B. thuringiensis*. Nous avons pu séparer par chromatographie sur CM-cellulose et caractériser, par leur action sur des substrats synthétiques, ces protéases qui présentent chacune une activité lytique sur les cristaux.

Outre leur poids moléculaire identique (de l'ordre de 32 000), ces protéases ont un certain nombre de propriétés semblables : leur pH optimum d'action, leur thermorésistance et leur sensibilité identique à l'action des ions métalliques. Il n'est pas surprenant que ces enzymes de même origine et destinés à la même fonction, soient sensibles de manière identique à ces différents facteurs. Il est d'ailleurs connu que les protéases extraites d'un même milieu biologique sont généralement très voisines et difficiles à séparer ; c'est ainsi par exemple que Murachi et Neurath (127), puis Gharbani (60) ont montré l'existence de cinq fractions différentes présentant une activité protéolytique à partir du précipité acétonique de tiges d'ananas (bromelaïne).

De plus, les enzymes de *Pieris*, qui présentent tous les deux une activité estérasique, sont inhibés par le diisopropylfluorophosphate, mais ne sont pas inactivés par l'EDTA ni par les inhibiteurs de groupes -SH. Ils appartiennent donc au troisième groupe de protéases décrit par Smith (158) et dans lequel figurent trypsine, chymotrypsine et subtilisine.

Ces protéases, très semblables, présentent des mobilités électrophorétiques légèrement différentes qui ont permis leur identification sur gel d'amidon et sur gélose. Les propriétés immunologiques mettent en évidence l'existence de deux systèmes de précipitation antigène-anticorps différents, spécifiques de chaque préparation enzymatique et permettent de les caractériser. Ces différents critères et l'analyse par ultracentrifugation permettent de penser que les fractions actives obtenues en fin de purification correspondent aux deux enzymes à l'état pur et qu'il n'existe pas

d'autres protéases dans le chyle, dans les conditions où nous avons travaillé.

Par l'étude de l'action de ces protéases sur des substrats peptidiques de structure connue : insuline et glucagon, et sur un grand nombre de substrats synthétiques, nous avons pu définir la spécificité de chacun des enzymes : l'enzyme 1 (le premier élué après chromatographie sur CM-cellulose) hydrolyse les liaisons peptidiques au niveau de tous les acides aminés aromatiques, de la leucine et de l'alanine ; l'enzyme 2 agit au niveau du carboxyle des acides aminés basiques, arginine et lysine, et à plus faible vitesse au niveau de la leucine et de l'alanine. En ce qui concerne l'enzyme 1, nous nous sommes demandé si son action se manifestait exclusivement au niveau du carboxyle (c'est le cas pour la chymotrypsine) ou au niveau du groupement NH_2 avec coupure secondaire à l'extrémité carboxylique (cas de la pepsine). Les résultats que nous avons déjà rapportés indiquent que l'attaque se fait principalement au niveau du carboxyle, cependant il pouvait subsister quelques doutes. Nous avons donc réuni dans le tableau XXXIII l'action de l'enzyme 1 sur différents substrats, ce qui

Tableau XXXIII

Vitesse d'hydrolyse de différents substrats aromatiques et aliphatiques par l'enzyme 1 de Pieris

Substrats $2{,}5.10^{-3}$	Activité - Enzyme 1
CBZ-Phe-Phe	10
CBZ-Phe-Leu	5,2
CBZ-Gly-Phe	0,26
CBZ-Leu-Phe	4,5
CBZ-Leu-Gly	0,63
CBZ-Ala-Leu	2,6

Les résultats sont exprimés en µMoles de substrat hydrolysées/mn/µg d'enzyme X 10^3.

nous permet de confirmer définitivement l'attaque au niveau du carboxyle : l'action de l'enzyme sur les substrats : CBZ-Phe-Phe, et CBZ-Leu-Phe peut indifféremment s'expliquer par l'hydrolyse au niveau du carboxyle ou du NH_2 de la phénylalanine et de la leucine, mais, si l'on compare l'hydrolyse des substrats CBZ-Phe-Phe et CBZ-Gly-Phe, nous voyons que dans ce dernier cas l'hydrolyse est pratiquement nulle ; ce résultat est en faveur de l'attaque enzymatique au niveau du carboxyle.

En ce qui concerne la leucine, un autre problème se pose. Si nous comparons les résultats obtenus avec les deux substrats : CBZ-Leu-Phe et CBZ-Leu-Gly, nous remarquons l'hydrolyse beaucoup plus faible de ce dernier substrat. Dans le cas de la leucine et des acides aminés aliphatiques, il apparaît donc que l'hydrolyse, effectuée en principe au niveau du carboxyle, dépende essentiellement de l'acide aminé adjacent. De même, alors que la liaison Ala-Leu est hydrolysée par l'enzyme 2 dans le substrat CBZ-Ala-Leu, la liaison Ala-Glu dans le glucagon ne semble pas être hydrolysée par cet enzyme. Il est important de faire cette remarque, puisque l'hydrolyse des liaisons aliphatiques dans les protéines doit dépendre principalement de la position relative des différents acides aminés dans les chaînes peptidiques. Ce phénomène a d'ailleurs été signalé par Tang (171) à propos de la pepsine et même de la chymotrypsine. Cet auteur pense que la pepsine peut rompre un certain nombre de liaisons peptidiques (valine, leucine, glycine glumatique) lorsque ces acides aminés sont dans le voisinage d'une tyrosine ou d'une phénylalanine, d'où le rôle de l'environnement dans la spécificité.

C'est ainsi que des coupures secondaires sont observées au cours de l'hydrolyse des chaînes de l'insuline par la pepsine (152) et de l'hydrolyse du chymotrypsinogène par la chymotrypsine (147). Ces différentes observations montrent qu'en fait le schéma de la protéolyse au cours de l'attaque des substrats protéiques est compliqué par la rupture de liaisons moins spécifiques (41). Nous avons vu, au cours de cette étude, que l'on pouvait facilement expliquer l'hydrolyse du glucagon, alors qu'il était déjà beaucoup plus difficile d'interpréter l'hydrolyse de l'insuline.

Par l'ensemble de leurs propriétés et par leur spécificité, les protéases de *Pieris* qui sont typiquement des endopeptidases, présentent certaines analogies avec les enzymes du même groupe : trypsine et chymotrypsine.

Ces similitudes ne doivent pas nous faire oublier les propriétés particulières de ces enzymes qui leur confèrent un intérêt plus général et rendent leur application possible dans le domaine de la protéolyse. Sur le plan pratique, l'intérêt de ce système est double :

1° Les conditions d'action de ces enzymes, principalement pH optimum et spécificité, permettent de les utiliser pour l'hydolyse des protéines natives. Nous avons vu que l'une des caractéristiques essentielles de ces protéases est leur pH d'activité en milieu alcalin entre pH 9,5 et pH 10,7 ; à pH 9,0 elles conservent encore 50 p. 100 de leur activité. L'optimum dans cette zone de pH est assez rare, c'est le cas de certains enzymes comme l'arginase (57) ou la tyramine oxydase (76). Cette propriété semble par contre être commune à plusieurs espèces d'insectes ; nous avons pu remarquer chez un autre Lépidoptère : Bombyx mori (dont le

pH intestinal est de l'ordre de 10,0), l'existence de protéases actives dans cette zone de pH.

D'autre part, trois autres caractères différencient les protéases de *Pieris* de la trypsine ou de la chymotrypsine :

— la vitesse d'hydrolyse des différents substrats aromatiques ou basiques par ces protéases est 10 à 20 fois supérieure à celle qui est manifestée par la trypsine ou la chymotrypsine.

— le spectre d'action des préparations de *Pieris* est plus large que celui de la trypsine ou de la chymotropsine, ainsi les liaisons aromatiques et alyhatiques (leucine, alanine) sont hydrolysées à vitesse égale par l'enzyme 1, alors qu'il n'en est pas ainsi pour la chymotrypsine.

— leur efficacité se manifeste en présence de liaisons disulfure, ainsi que nous l'avons observé au cours de l'hydrolyse de l'insuline native par exemple.

Il résulte de ces propriétés que le nombre de liaisons sensibles à ces enzymes se trouve considérablement accru par rapport aux autres protéases. D'où l'attaque possible de l'insuline et de l'albumine natives que nous avons signalée au cours de l'étude de la spécificité.

Cependant, la question se pose de savoir si au pH 9,5 utilisé pour l'hydrolyse, les protéines sont encore à l'état natif. Nous devons admettre qu'à ce pH certaines modifications de structure doivent se p r o d u i r e , facilitant l'attaque enzymatique. Il ne peut s'agir que de modifications réversibles puisque l'albumine portée à pH 9,5 et ramenée à pH 8,0 n'est toujours pratiquement pas attaquée par la trypsine ou la chymotrypsine.

Nous avons déjà abordé cette discussion en étudiant la spécificité ; nous aimerions rappeler l'influence du pH sur la protéolyse qui a été particulièrement envisagée dans le cas de la pepsine par Christensen (36). Cet auteur pense que le pH influence l'hydrolyse pepsique non seulement en créant des conditions électrostatiques favorables mais aussi en accélérant le changement de structure initial des substrats, permettant la protéolyse.

Des considérations de cet ordre, ainsi que les particularités de la spécificité que nous avons précisées ci-dessus, contribuent à expliquer l'attaque des protéines natives par les enzymes de *Pieris ;* ces différents facteurs permettent une plus grande accessibilité des sites actifs des protéases aux liaisons du substrat sensibles à leur action. L'avantage de ces protéases sur la pepsine serait de réaliser la protéolyse dans des conditions d'action ne donnant pas lieu à des modifications irréversibles des structures (la pepsine au pH 1,6 agit en fait sur des substrats totalement dénaturés (164).

2° Enfin, l'existence de ces protéases suscite quelques réflexions sur le plan plus général de l'évolution des espèces. Il est intéressant de constater que ce groupe d'insectes possède des

protéases assez voisines de celles qui existent dans l'appareil digestif des animaux supérieurs. Chez les mammifères, par exemple, l'attaque primaire des protéines est réalisée en milieu acide par la pepsine avec libération de fragments peptidiques qui subissent ensuite l'action de la trypsine et de la chymotrypsine à leur pH physiologique. Dans le cas de *Pieris*, le système est plus simple : les protéases que nous avons décrites agissent simultanément dans un même milieu biologique au pH 9,5, et elles attaquent sans dénaturation préalable les protéines ingérées par l'insecte. Ces protéases joueraient à la fois le rôle de la pepsine, de la trypsine et de la chymotrypsine.

Il serait intéressant d'étendre cette étude à d'autres espèces de Lépidoptères et notamment à *Bombyx mori* (dont nous avons déjà parlé et dont les protéases sont actives en milieu alcalin) et de vérifier que les mécanismes de protéolyse chez ce groupe d'invertébrés sont comparables à ceux qui sont observés chez les animaux supérieurs.

Dans la deuxième partie de ce travail, après avoir expliqué le mécanisme d'action des protéases, nous avons étudié le cristal de *B. thuringiensis* et son hydrolyse par ces enzymes dont il est un substrat naturel.

Nous avons tout d'abord rappelé la nature protéique du cristal nommé aussi inclusion parasporale. L'édification de cette volumineuse macromolécule au moment de la sporulation, à partir de chaînes peptidiques solubles, pose un problème qu'il serait intéressant d'étudier. Les seules données que nous ayons à ce sujet sont celles de Young et Fitz-James (185) : cette structure résulterait de la formation de liaisons disulfures entre les chaînes protéiques synthétisées. Nous avons pu vérifier cette hypothèse et montrer que les substances réductrices susceptibles de couper les ponts disulfures : cystéine et thioglycolate, solubilisent les cristaux par dissociation des chaînes protéiques qui les constituent. L'analyse des produits de dissolution effectuée par des méthodes physiques : ultracentrifugation et électrophorèse, nous a permis de mettre en évidence la présence d'au moins trois constituants, parmi lesquels une protéine de faible poids moléculaire (environ 10 000) que nous avons cherché à isoler. On pourrait d'ailleurs se demander dans quelle mesure ce constituant ne serait pas la sous-unité de base dont la polymérisation donnerait naissance aux chaînes protéiques de poids moléculaire plus élevé trouvées dans la préparation ; nous avons en effet obtenu ce constituant en proportion variable suivant les préparations (tableau XXI). Cependant, la détermination des groupements NH_2 terminaux de ces constituants par la technique au DNFB est contraire à cette hypothèse. Nous obtenons plusieurs acides aminés terminaux : DNP-Glu, DNP-

Ser, DNPAsp, DNP-Lys, ce qui semblerait indiquer la présence de plusieurs protéines différentes. A ce propos, il est inéressant de remarquer que les DNP terminaux trouvés dans le cristal de *B. thuringiensis* sont en partie identiques à ceux qui ont été déterminés pour les protéines de ribosomes chez *E. coli* par Waller (179) (180).

Nous retenons donc l'hypothèse de plusieurs chaînes protéiques reliées entre elles par des ponts disulfure et organisées selon une structure régulière obéissant à une périodicité de 252 Å proposée par Norris (130).

En ce qui concerne la composition proprement dite de ce cristal, nous devons rappeler la prédominance des acides aminés dicarboxyliques : glutamique et aspartique (qui totalisent 20 p. 100 des acides aminés), de l'arginine, du groupe leucine et des acides aminés aromatiques. Il est permis de supposer que la forte proportion des acides aminés dicarboxyliques et diaminés contribue, par les forces d'attraction qui en résultent, à assurer la stabilité de la structure. Nous avons d'ailleurs montré la solubilité de l'inclusion en milieu alcalin et nous avons pu constater que la dissolution par rupture des ponts disulfure, possible à pH 8,0, est plus complète lorsque le pH est supérieur à 9,0 ; ces remarques, ainsi que l'instabilité des produits résultant de la dissolution en milieu de pH inférieur à 6,0, semblent mettre en évidence le caractère acide de la protéine du cristal. Il apparaît alors que le cristal se comporte comme un ensemble organisé, dissociable sous l'influence des réducteurs ou par modification de l'ionisation du milieu. La cohésion de cette structure et la présence de nombreuses liaisons disulfure rendent l'inclusion difficilement attaquable par voie enzymatique.

Or, nous avons montré que les enzymes de *Pieris* solubilisent totalement des suspensions de cristaux dans les conditions expérimentales identiques à celles qui sont réalisées *in vivo* chez la *Piéride*. Nous avons souligné qu'il s'agit bien d'une réaction de protéolyse et non d'une réaction secondaire (réduction ou modification de l'ionisation du milieu). En effet, la lyse du cristal par action des protéases de *Pieris* est sensible aux mêmes facteurs que la réaction de protéolyse sur des protéines connues : action de la température, inhibition par les ions et par le DFP.

Comment chacun de ces enzymes peut-il attaquer une telle structure ?

Nous avons expliqué l'hydrolyse de protéines natives autres que le cristal par la spécificité et les conditions d'action particulières de ces protéases. Ces mêmes facteurs interviennent dans le cas du cristal qui, de plus, est une protéine insoluble ; d'autre part, la présence de quantités importantes d'arginine, de leucine et d'acides aminés aromatiques laisse prévoir qu'un grand nombre de liaisons doivent être sensibles à l'action de ces enzymes. Enfin,

nous avons vu que la présence de liaisons disulfures ne semble pas empêcher l'action de ces protéases (hydrolyse de l'insuline).

L'ensemble de ces considérations permet d'expliquer l'hydrolyse enzymatique de la molécule ainsi constituée, par les protéases de *Pieris*. Nous avons étudié l'hydrolyse enzymatique du cristal dans les conditions où elle se trouve réalisée *in vivo*, c'est-à-dire, par le mélange de deux enzymes. Le fractionnement préliminaire du lysat sur Sephadex 75 a permis de séparer deux groupes de constituants de poids moléculaire différent ; l'un est composé de grosses molécules protéiques, l'autre de peptides et acides aminés libres. Une fraction importante de l'hydrolysat est donc constituée par des molécules résistant à une première attaque enzymatique dans les conditions où celle-ci est réalisée. Nous nous sommes particulièrement intéressée à la partie peptidique du lysat et nous avons cherché à isoler les plus gros peptides (poids moléculaire de l'ordre de 5 000) avec l'intention de mettre en évidence la spécificité des enzymes d'hydrolyse par l'identification de l'extrémité carboxylique de ces peptides. La séparation de quatre peptides dont l'extrémité C terminale est leucine ou alanine et l'identification des acides aminés libres présents dans l'hydrolysat (tyrosine, phenylalanine, leucine, alanine, arginine et lysine) permettent de confirmer l'attaque enzymatique au niveau du carboxyle de la leucine, de l'alanine (enzyme 1 et enzyme 2), des acides aminés aromatiques (enzyme 1), et des acides aminés basiques (enzyme 2).

Le deuxième objectif sur lequel nous avons centré cette étude de l'hydrolyse enzymatique des cristaux était la recherche de la toxicité parmi les différentes fractions du lysat.

Nous avons montré comment la protéolyse est accompagnée de la libération du motif toxique. Les lysats enzymatiques deviennent directement toxiques par injection dans la cavité générale, alors que les cristaux seuls ou les produits de la dissolution sodique sont actifs seulement *per os*. L'apparition de la toxicité par injection dans les lysats confirme l'hypothèse qui fut à l'origine de ce travail. Au cours de l'intoxication des Piérides par *B. thuringiensis*, les cristaux ingérés sont hydrolysés dans le tube digestif par les protéases du chyle ; il en résulte l'apparition des symptômes toxiques que nous avons décrits : paralysie buccale se traduisant par un arrêt de l'alimentation et aboutissant à la mort des larves.

Le lysat total ou les constituants de la fraction protéique du lysat, quelle que soit la manière dont ils sont administrés (ingestion ou injection) provoquent des symptômes identiques à ceux qui sont donnés par l'ingestion des cristaux seuls, pour des doses similaires ou légèrement inférieures, doses très faibles d'ailleurs qui permettent de ranger le cristal et ses dérivés dans la catégorie des substances hautement toxiques. Enfin, il est intéressant de constater que le motif toxique est aussi porté par des molécules plus petites : des peptides, dont la toxicité globale est aussi importante

que celle des fractions protéiques. Cependant, les peptides isolés par les chromatographies successives réalisées à 35°, manifestent une toxicité plus faible, résultant vraisemblablement d'une inactivation en cours de préparation.

Nous avons montré, au terme de ce travail, que la dissolution enzymatique du cristal avec libération de la toxicité ne peut être réalisée que par les seules protéases de *Pieris* (pepsine exceptée). Les protéases de spécificité voisine : trypsine et chymotrypsine, dans les conditions optimum de leur action, ne peuvent attaquer cette inclusion sans dénaturation préalable. Les conditions expérimentales nécessaires à l'attaque de la protéine figurée ne se trouvent pas réalisées au cours de l'action de ces derniers enzymes qui ne peuvent accéder aux liaisons sensibles à leur action.

La structure de cette molécule cristalline, dont la cohésion est assurée par la formation de liaisons disulfures entre les chaînes protéiques, semble être organisée de manière telle qu'un certain nombre de liaisons peptidiques sensibles à l'action des protéases de *Pieris* et correspondant à leur spécificité sont directement accessibles aux sites actifs de ces enzymes. L'hydrolyse enzymatique qui en résulte désorganise complètement la structure de la molécule, démasquant ainsi le motif toxique porté par les différentes fractions libérées au cours de la réaction.

Cet aspect de l'action enzymatique : transformation du cristal protoxine en toxine vraie rejoint le problème plus général de l'activation. La formation d'une molécule présentant une activité biologique (enzymatique ou autre) à partir d'un précurseur inactif par une réaction de protéolyse est fréquente dans les milieux biologiques : la transformation du trypsinogène (94) (95), du chymotripsinogène (146) du fibrinogène sont les exemples les plus courants. L'élimination d'un peptide ou l'ouverture d'une structure cyclique suffisent à faire apparaître l'activité biologique selon un processus enzymatique très spécifique (rupture de la liaison arginyl-isoleucine dans le cas du chymotrypsinogène par exemple). En ce qui concerne la toxine de *B. thuringiensis*, la dispersion de la structure cristalline par rupture de liaisons peptidiques réalise l'activation du précurseur en libérant plusieurs protéines et peptides portant le motif toxique. Il semble que dans ce cas, l'activation résulte plus du déploiement de la structure que d'une action spécifique des enzymes, nous avons en effet montré que la solubilisation des cristaux par rupture des ponts disulfure réalise aussi l'activation de la protoxine.

Dans les deux cas : protéolyse et réduction, la structure de l'inclusion est modifiée de manière telle, que les groupements responsables de la toxicité sont démasqués selon des processus différents. On conçoit alors que dans le premier cas : protéolyse, les coupures réalisées par les enzymes selon leur spécificité d'action, libèrent des fragments actifs, protéines ou peptides, mais aussi des fragments inactifs constitués soit par des molécules pour

lesquelles le motif toxique n'a pas été démasqué, soit par des peptides très courts ne portant pas ce motif toxique. Dans le deuxième cas : réduction, la rupture des ponts disulfures sépare les chaînes protéiques constituant le cristal et démasque nécessairement le motif toxique, ce qui explique l'activité élevée des produits de réduction (cf tableau XXIX), toxicité supérieure à celle qui est obtenue avec la fraction protéique des lysats enzymatiques (tableau XXVI).

Ce phénomène d'activation du cristal, et en particulier l'activation par voie enzymatique, permet d'expliquer la pathogénicité de *B. thuringiensis* pour les larves de *Pieris brassicæ,* mais il pose le double problème de la nature du motif toxique et du mécanisme de l'intoxication.

Nous savons que le motif toxique est encore porté par des peptides dont le poids moléculaire est de l'ordre de 5 000 et nous avons montré la sensibilité à la température des préparations actives, ce qui semblerait indiquer qu'une certaine structure soit nécessaire au support du groupement toxique.

En ce qui concerne le processus de l'intoxication, il a été montré par Martouret (115) (116) que les symptômes précédemment décrits chez la Piéride : paralysie alimentaire et paralysie générale, sont accompagnés de troubles physiologiques : élévation du pH du tube digestif, altérations morphologiques de l'épithélium intestinal. Il semble cependant que ces dernières manifestations soient des phénomènes secondaires, le premier symptôme toxique étant la paralysie buccale qui se manifeste dans les premières heures suivant l'ingestion, d'où l'hypothèse de neurotoxine, émise à ce sujet (5) (114).

Au terme de ce travail, il apparaît que l'étude de l'hydrolyse enzymatique du cristal par les protéases de *Pieris brassicæ* pourra nous permettre, en déterminant la structure de la plus petite molécule active, de préciser la nature du motif toxique et d'aborder le problème du mécanisme de l'intoxication des larves par la protéine figurée de *B. thuringiensis.*

En *conclusion :* l'isolement et la caractérisation des deux protéases de *Pieris,* d'une part, l'étude de la composition et de la structure de l'inclusion parasporale de *B. thuringiensis,* d'autre part, nous ont permis d'expliquer l'action de ces enzymes sur la protéine cristalline et de mettre en évidence l'activation de la protoxine.

Cette étude limitée à *Pieris brassicæ* semble indiquer que la pathogénicité de *B. thuringiensis* pour les larves de certains Lépidoptères serait liée à la possibilité de réaliser, *in vivo,* l'hydrolyse enzymatique du cristal.

L'activation de la protéine figurée par voie expérimentale, devrait alors permettre d'étendre l'efficacité de cette toxine à d'autres espèces de Lépidoptères insensibles à *B. thuringiensis.*

RÉSUMÉ

Ce travail nous a permis d'étudier les protéases *de Pieris brassicæ* et le résultat de leur action sur le cristal protéique de *B. thuringiensis*.

Aux différents aspects de la question, que nous avons soulevés dans l'introduction, nous pouvons donner les réponses suivantes :

1° Il existe deux protéases dans le chyle de *Pieris brassicæ*. Ces protéases, très voisines par l'ensemble de leurs propriétés, se différencient principalement par leur spécificité et présentent certaines analogies avec les protéases gastro-intestinales des mammifères, l'une des protéases étant du type trypsine, alors que la deuxième est voisine de la chymotrypsine.

2° Ces enzymes se différencient des protéases les plus connues par leurs conditions d'action particulières : pH optimum et spécificité, qui permettent l'attaque des protéines natives.

3° Le substrat de ces protéases : le cristal de *B. thuringiensis* est une volumineuse protéine cristalline, constituée par plusieurs chaînes protéiques de poids moléculaire différent, assemblées par des liaisons disulfure et organisées en une structure visible au microscope optique.

4° Ce substrat complexe est hydrolysé à l'état natif par les protéases de *Pieris*, en plusieurs constituants de poids moléculaires très différents ; protéines, peptides et acides aminés libres et la nature des liaisons peptidiques hydrolysées est conforme à la spécificité des enzymes.

5° Au cours de la réaction d'hydrolyse, le motif toxique responsable de la pathogénicité de l'inclusion se trouve démasqué. Ce motif toxique peut être porté par des molécules de tailles différentes : protéines ou peptides.

6° Les protéases les plus connues, dont la spécificité est voisine de celle des enzymes de *Pieris*, ne peuvent effectuer cette hydrolyse du cristal à l'état natif.

Nous avons montré que ces protéases constituent chez ce groupe d'insectes un système enzymatique simple, comparable, par son efficacité, à celui qui réalise la dégradation des protéines chez les vertébrés supérieurs. La caractéristique principale de ce

système est l'attaque des protéines natives et en particulier du cristal de *B. thuringiensis*.

Dans ce dernier cas, le principal intérêt du système est de mettre en jeu l'hydrolyse d'une protéine cristalline dont la structure résiste à l'attaque des protéases les plus connues.

L'action des protéases de *Pieris* sur ce substrat, dont le résultat est l'activation du cristal, explique de ce fait la pathogénicité des bacilles porteurs de l'inclusion parasporale, pour les larves de certains lépidoptères, et permettra d'envisager l'étude du mécanisme de l'intoxication.

BIBLIOGRAPHIE

1 ACHER (R.) et CROCKER (C.). — *Biochem. Biophys. Acta*, **9**, 704,, 1952.
2 ANDREWS (P.). — *Biochem. J.*, **91** 222, 1964.
3 ANFINSEN (C.-B.) et HABER (E.). — *J. Biol. Chem.*, **236**, 1361, 1961.
4 ANGUS (T.-A.). — *Nature*, **173**, 545, 1954.
5 ANGUS (T.-A.). — *Can. J. Microbiol.*, **2**, 111, 1956.
6 ANGUS (T.-A.). — *Can. J. Microbiol.*, **2**, 122, 1956.
7 ANGUS (T.-A.). — *Can. J. Microbiol.*, **2**, 416, 1956.
8 ANGUS (T.-A.). — *J. Insect. Pathology*, **1**, 97, 1959.
9 ANSON (M.-L.). — *J. Gen. Physiol.*, **22**, 79, 1938.
10 ANSON (M.-L.) et MIRKSY (L.-E.). — *J. Gen. Physiol.*, **17**, 399, 1934.
11 BAGDASARIAN (M.), MATHESON (N.-A.), SYNGE (R.-M.) et YOUNGSON (M.-Y.). — *Biochem. J.*, **91**, 1964.
12 BALLS (A.-K.) et JANSEN (E.-F.). — *Adv. in Enzymology*, **13**, 34, 1952.
13 DE BARJAC (H.) et BONNEFOI (A.). — *Entomophaga*, **7**, 6, 1962.
14 BARRON (E.-S.-G.). — *Adv. in Enzymology*, **11**, 201, 1951.
15 BEGUIN (S.) et MARTOURET (D.). — *C.R. IV^e Cong. Int. de Lutte contre les Ennemis des Plantes* - Hambourg, 1957, p. 885.
16 BERGMANN (M.) et FRUTON (J.-S.). — *Adv. in Enzymology*, **1**, 63, 1941.
17 BERGMANN (M.). — *Adv. in Enzymology*, **2**, 49, 1942.
18 BERGMANN (M.) et FRUTON (J,-S.). — *J. Biol. Chem.*, **118**, 405, 1937.
19 BERGMANN (M.) et ZERVAS (L.). — *Ber.* 65 B, 1192, 1932.
20 BERLINER (E.) *Z. ges. Getreidew*, **3**, 63, 1911.
21 BERLINER (E.). — *Z. angew. Entomol.*, **2**, 29, 1915.
22 BERNARD (S.), BOULANGER (Y.), DAUTREVAUX (M.) et BISERTE (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **43**, 1289, 1961.
23 BISERTE (G.) et OSTEUX (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, 50, 1951.
24 BLACKBURN (S.) et LOWTHER (A.-G.). — *Biochem. J.*, **48**, 126, 1951.
25 BOILLING (D.), SOBER (H.-A.) et BLOCK (R.-J.), *Fed. Proceed.*, **8**, 185, 1949.
26 BOMAN (H.-M.) et KALETTA (U.).— *Biochem Biophys.* Acta, **24**, 619, 1957.
27 BOVEY (F.-A.) et SAM YANARI (S.). — *The Enzymes*, vol. IV, p. 63.
28 BOYER (P.-D.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 4331, 1954.
29 BRICAS (E.), NICOT (C.) et LEDERER (E.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **44**, 1115, 1962.
30 BROMER (W.-S.), STAUB (R.), SINN (G.) et BEHRENS (O.-K.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 2801, 1957.
31 BROMER (W.-S.), STAUB (R.), SINN (G.) et BEHRENS (O.-K.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 2807, 1957.

32 BULGER (J.-W.). — *J. Econ. Ent.*, **28**, 76, 1935

33 BURGERJON (A.). — *Entomophaga*, **2**, 129, 1957.

34 BURGERJON (A.). — *Ann. Epiphyties*, **13**, 595, 1962.

35 CHRISTENSEN (L.-K.). — *C.R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Chim.*, **28**, 37, 1952.

36 CHRISTENSEN (L.-K.). — *Arch. Biochim. Biophys.*, **57**, 163, 1955.

37 CREWTHER (W.-B.). — *Australian J. Biol. Soc.*, **6**, 597, 1953.

38 DAVIES (N.-C.) et SMITH (E.-L.). — *Method of Biochem. Analysis*, **2**, p. 250.

39 DEDONDER (R.) et LECADET (M.). — *C.R. Coll. Int. Pathol. Insectes*, Paris, 1962, p. 197.

40 DELAPORTE (B.) et BEGUIN (S.). — *Ann. Inst. Pasteur*, **89**, 632, 1955.

41 DESNUELLE (P.), ROVERY (M.) et BONJOUR (G.). — *Biochem. Biophys. Acta*, **5**, 116, 1950.

42 DIXON (F.-J.), MAURER (P.-H.) et DECHMILLER (M.-P.). — *J. of Immunology*, **72**, 179, 1954.

43 DOHERTY (D.-G.) et VASLOW (F.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 931, 1952.

44 DUTSKY (S.-R.). — *Bur. Ent. Plant. quar.* ET 192, p. 10.

45 EBATA (M.) et YASUBONU (K.-T.). — *Biochem. Biophys. Acta*, **73**, 132, 1963.

46 ELLIS (S.) et SIMPSON (M.-E.). — *Fed. Proceed.*, **14**, 44, 1955.

47 EMANUILOFF (I.). — *Enzymologia*, **20**, 173, 1959.

48 FINCKE (B.-J.) et SMITH (E.-L.). — *J. Biol. Chem.*, **230**, 669, 1958.

49 FINE (J.-M.) et MORETTI (J.-M.). — *Le Pharmacien Biologiste, II*, N° 20, p. 345.

50 FITZ-JAMES (P.), TOUMANOFF (C.) et YOUNG (E.). — *Can. J. Microbiol.*, **4**, 386, 1958.

51 FOLIN (O.) et CIOCALTEU (V.). — *J. Biol. Chem.*, **73**, 627, 1927.

52 FRAENKEL-CONRAT (H.), HARRIS (J.-I.) et LEVY (A.-L.). — *Meth. of Biochem. Anal.*, **2**, 360, 1955.

53 FRAENKEL-CONRAT (H.) et PORTER (R.-R.). — *Biochem. Biophys. Acta*, **9**, 557, 1952.

54 FRAENKEL-CONRAT (H.), MOHAMMAD (A.), DUCAY (E.-D.) et MECHAM (D.-K.). — *J. AM. Chem. Soc.*, **73**, 625, 1951.

55 FREUND (J.) et MAC DERMOTT (K.). — *Proc. Soc., Exper. Biol. and Med.*, **49**, 548, 1942.

56 FRUTON (J.-S.), JOHNSTON (R.-B.) et FRIED (M.). — *J. Biol. Chem.*, **190**, 39, 1951.

57 FRUTON (J.-S.) et SIMMONDS (S.). — *General Biochemistry*, p. 260, 1953.

58 GELOTTE (B.). — *J. of Chromatography*, **3**, 330, 1960.

59 GELOTTE (B.) et KRANTZ (A.-B.). — *Acta Chem. Scand.*, **13**, 2127, 1959.

60 GHARBANI (M.). — *Biochemistry*, **2**, 416, 1963.

61 GOLDENBERG (V.), GOLDENBERG (H.) et MACLARAN (A.-D.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 5317, 1950.

62 GOLDENBERG (H.), GOLDENBERG (V.) et MACLARAN (A.-D.). — *Biochem. Biophys. Acta*, **7**, 110, 1951.

63 GORINI (C.) et FELIX (F.). — *Biochem. Biophys. Acta*, **11**, 535, 1953.

64 GRABAR (P.) et WILLIAMS (C.-A.). — *Biochem Biophys. Acta*, **17**, 67, 1955.

65 GREEN (A.-A.) et HUGUES (W.-L.). — *Methods in Enzymol.*, Vol. I, p. 82.

66 GREEN (N.-M.) et NEURATH (H.). — *The proteins*, Vol. II, part B, p. 1094, 1954.
67 GREEN (N.-M.), GLADNER (J.-A.) et CUNNINGHAM (W.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2122, 1952.
68 GREEN (N.-M.) et NEURATH (H.). — *J. Biol. Chem.*, **204**, 379, 1953.
69 GREEN (N.-M.). — *Nature*, **178**, 145, 1956
70 GRISON (P.) et SYLVESTRE DE SACY (R.). — *Ann. Epiphyties*, **4**, 663, 1956.
71 GROSSBERG (A.-L.), STELOS (T.) et PRESSMAN (D.). — *Proc. Nat., Ac. Sc.*, **48**, 1203, 1962.
72 HABER (E.) et ANFINSEN (C.-B.). — *J. Biol. Chem.*, **236**, 422, 1961.
73 HAMPSON (S.-E.), MILLS (J.-L.) et SPENCER (T.) — *Biochem. Biophys. Acta*, **73**, 476, 1963.
74 HANNAY (C.-L.). — *Nature*, **172**, 1004, 1963.
75 HANNAY (C.-L.) et FITZ-JAMES (P.). — *Can. J. Microbiol.*, **1**, 694, 1955.
76 HARE (M.-L.). — *Biochem. J.*, **22**, 968, 1928.
77 HARMON (K.-D.) et NIEMANN (C.). — *J. Biol. Chem.* **178**, 743, 1949.
78 HEIMPEL (A.-M.) et ANGUS (T.-A.). — *J. Insect Pathology*, **1**, 152, 1959.
79 HIRS (C.-H.-W.), MOORE (S.) et STEIN (W.-H.). — *J. Biol. Chem.*, **235**, 633, 1960.
80 HUANG (H.-T.), FOSTER (R.-J.) et NIEMANN (C.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 105, 1952.
81 HUANG (H.-T.) et NIEMAN (C.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1541, 1951.
82 INAGAMI (T.) et STURTEVANT (J.-M.). — *J. Biol. Chem.*, **235**, 1019, 1960.
83 INGRAM (V.-M.). — *Biochem. Biophys. Acta*, **28**, 538, 1958.
84 INGRAM (V.-M.). — *Biochem. Biophys. Acta*, **49**, 520, 1961.
85 JERSON (J.-P.) et SMITH (I.). — *Nature*, **172**, 1100, 1953.
86 JOHANSEN (P.-G.). — *Biochem. J.*, **77**, 239, 1960.
87 JOHNSON (M.-J.). — *J. Biol. Chem.*, **137**, 575, 1941.
88 JUTISZ (M.). — *Chromatographie en Chimie organique et biologique*, Vol. II, p. 371.
89 KABAT (E.-A.) et MAYER (M.-M.). — *Experimental Immunochemistry*, p. 86.
90 KAUFMAN (S.) et NEURATH (H.). — *Arch. Biochem.*, **21**, 437, 1949.
91 KIMMEL (J.-R.) et SMITH (E.-L.). — *J. Biol. Chem.*, **207**, 515, 1954.
92 KORNGOLD (L.). — *J. Immunol.*, **77**, 119, 1956.
93 KUNITZ (M.). — *J. Gen. Physiol.*, **29**, 149, 1946.
94 KUNITZ (M.). — *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291, 1947.
95 KUNITZ (M.). — *J. Gen. Physiol.*, **32**, 241, 1948.
96 LABOUESSE (B.). — *Thèse Doct. Etat* - Fac. Sciences, Paris, 1961.
97 LAPRESLE (C.) et WEBB (T.). — *Biochem. J.*, **76**, 538, 1960.
98 LECADET (M.) et MARTOURET (D.). — *C. R. Acad. Sc.*, **254**, 2457, 1962.
99 LECADET (M.) et DEDONDER (R.). — *C. R. Acad. Sc.*, **258**, 3117, 1964.
100 LECADET (M.) et DEDONDER (R.). — *C. R. Acad. Sc.*, **258**, 3380, 1964.
101 LECADET (M.) et MARTOURET (D.). — *C. R. Coll. Int. Pathol. Insectes*, Paris 1962, p. 204.
102 LEVY (A.-L.) et LEE (C.-H.). — *J. Biol. Chem.*, **213**, 487, 1955.
103 LI (C.-H.), COLE (R.-D.), CHUNG (O.) et LEONIS (J.). — *J. Biol. Chem.* **227**, 207, 1957.
104 LINDERSTROM-LANG (K.), HOTCHKISS (R.-D.) et JOHANSEN (G.). — *Nature*, **142**, 996, 1938.

105 LINEWEAVER (H.) et SCHWIMMER (S.). — *Enzymologia*, **10**, 81, 1941.
106 LINEWEAVER (H.) et BURK (D.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658, 1934.
107 LOWRY (O.-H.), ROSEBROUGH (N.-J.), FARR (A.-L.) et RANDALL (R.-J.). — *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
108 LUNDBLAD (G.). — *Act. Chem. Scand.*, **16**, 975, 1962.
109 LUNDBLAD (G.) et RUNNSTROM (J.). — *Exp. Cell. Research*, **27**, 328, 1962.
110 MAC ALLISTER (R.-V.) et NIEMANN (C.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 3854, 1949.
111 MANSI (W.). — *J. Comp. Path.*, **67**, 297, 1957.
112 MARTIGNONI (M.). — *Anstalt.*, **32**, 371, 1957.
113 MARTOURET (D.). — *C. R. XIII^e Symp. Phytia Phyto*, Gand, 1961, p. 1116.
114 MARTOURET (D.). — *C. R. XI^e Cong. Int. Ent.*, Vienne, 1960, p. 849.
115 MARTOURET (D.). — *C. R. Coll. Int. Path. Insectes*, Paris, 1962, 213.
116 MARTOURET (D.). — *C. R. XII^e Cong. Int. Ent.* Londres, 1964 (sous presse).
117 MATTES (O.). — *Gesel. f. Geford, Ges. Naturw. Sitzberg Marburg*, **62**, 381, 1927.
118 MEEDOM (B.). — *C. R. Trav. Lab. Carlberg Ser Chim.*, **29**, 403, 1955.
119 MIRANDA (F.). — *Thèse Fac. Sc.*, Aix-Marseille, 1964.
120 MONIER (R.) et JUTISZ (M.). — *Biochem. Biophys. Acta.*, **14**, 551, 1954.
121 MONRO (R.-E.). — *J. Gen. Microbiol.*, **21**, 1, IV, 1959.
122 MONRO (R.-E.). — *J. Biophys. Biochem. Cyt.*, **11**, 321, 1961.
123 MONRO (R.-E.). — *Biochem. J.*, **81**, 225, 1961.
124 MOORE (S.), SPACKMAN (D.-H.) et STEIN (W.-H.). — *Ann. Chem.*, **30**, 1185, 1958.
125 MOORE (S.) et STEIN (W.-H.). — *J. Biol. Chem.*, **176**, 367, 1958.
126 MORIHARA (K.). — *Biochem. Biophys. Acta*, **73**, 113, 1963.
127 MURACHI (T.) et NEURATH (H.). — *J. Biol. Chem.*, **235**, 99, 1960.
128 NACHMANSOHN (D.) et WILSON (I.-B.). — *Adv. in Enzymol.*, **12**, 259, 1951.
129 NEURATH (H.) et SCHWERT (G.-W.). — *Chem. Review*, **46**, 69, 1950.
130 NORRIS (J.-R.) et WATSON (D.-H.). *J. Gen. Microbiol.*, **22**, 744, 1960.
131 OUCHTERLONY (O.). — *Ark. for kemi. Mineralogy Och. Geologi*, **26**, 1, 1949.
132 OUDIN (J.). — *Ann. Inst. Pasteur*, **75**, 30, 1948.
133 PETERSON (E.-A.) et SOBER (H.-A.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1711, 1954.
134 PIEZ (K.-A.) et MORRIS (L.). — *Anal. Biochem.*, **1**, 187, 1960.
135 PILLEMER (L.) et HUTCHINSON (M.-C.). — *J. Biol. Chem.*, **158**, 299, 1945.
136 PORATH (J.) et FLODIN (P.). — *Nature*, **183**, 1657, 1959.
137 PORATH (J.). — *Cl. Chim. Acta*, **4**, 776, 1959.
138 PORATH (J.). — *Biochem. Biophys. Acta*, **39**, 193, 1960.
139 PORATH (J.) et LINDNER (E.-B.). — *Nature*, **191**, 69, 1961.
140 PORTIS (R.-A.) et ALTMAN (K.I.). — *J. Biol. Chem.*, **169**, 203, 1947.
141 POULIK (M.-D.). — *Biochem. Biophys. Acta*, **44**, 390, 1960.
142 PRIVAT DE GARILHE (M.) et LASHOWSKY (M.). — *Biochem. Biophys. Acta*, **18**, 370, 1951.

143 RHODES (M.-B.), AZARI (P.-R.) et FEENY (R.-E.). — *J. Biol. Chem.*, **230**, 399, 1958.

144 RICHARDS (F.-M.) et VITHA YATHIL (P.-J.). — *J. Biol. Chem.*, **234**, 1459, 1959.

145 RIMINGTON (C.). — *Biochem. J.*, **25**, 1062, 1931.

146 ROVERY (M.) et DESNUELLE (P.). — *Proc. Int. Cong. Biochem.*, 5th, Moscou 1961, N° 4, 210.

147 ROVERY (M.), POILROUX (M.), YASHIDA (A.) et DESNUELLE (P.). — *Biochem. Biophys. Acta*, **23**, 608, 1957.

148 RYLE (A.-P.) et PORTER (R.-R.). — *Biochem. J.*, **73**, 75, 1959.

149 SANGER (F.). — *Biochem. J.*, **39**, 507, 1945.

150 SANGER (F.). — *Biochem. J.*, **45**, 563, 1949.

151 SANGER (F.) et TUPPY (H.). — *Biochem. J.*, **49**, 481, 1951.

152 SANGER (F.) et THOMPSON (E.-O.-P.). — *Biochem J.*, **53**, 366, 1953.

153 SCHACHMAN (H.-K.). — *Methods in Enzymology*, **4**, p. 33.

154 SCHWERT (C.-W.) et EINSENBERG (M.-A.). — *J. Biol. Chem.*, **179**, 665, 1949.

155 SCHWERT (C.-W.), NEURATH (H.), KAUFMAN (S.) et SNOKE (J.-E.). — *J. Biol. Chem.*, **172**, 221, 1948.

156 SCHWERT (G.) et KAUFMAN (S.). — *J. Biol. Chem.*, **180**, 517, 1949.

157 SMITH (N.-R.), GORDON (R.-E.) et CLARKE (F.-E.). — *Agr. Monograph N°* 16, U.S. Department Agr., 1952.

158 SMITH (E.-L.). — *The Enzymes*, Vol. IV, p. 6.

159 SMITHIES (O.). — *Biochem. J.*, **71**, 585, 1959.

160 SMITHIES (O.). — *Biochem. J.*, **61**, 629, 1955.

161 SMITHIES (O.). — *Adv. in Prot. Chem.*, Vol. XIV, p. 65.

162 SOBER (H.-A.), GUTTER (F.-J.), WIYCKOFF (M.-W.) et PETERSON (E.-A.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 756, 1956.

163 SPEIZ (J.-R.) et CHAMBERS (D.-C.). — *Anal. Chem.*, **21**, 1249, 1949.

164 SRI RAM (J.) et MAURER (P.-M.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **70**, 185, 1957.

165 STEINER (R.-F.). — *Arch. Biochem., Biophys.*, **49**, 71, 1954.

166 STEINHAUS (E.-A.). — *Hilgardia*, **20**, 359, 1951.

167 STEINHAUS (E.-A.). — *Hilgardia*, **23**, 1, 1954.

168 STOCKELL (A.) et SMITH (E.-L.). — *J. Biol. Chem.*, **227**, 1, 1957.

169 SVEDBERG (T.). — *Kolloid Z.*, **36**, 53, 1925.

170 TABONE (J.), ROBERT (D.), THOMASEY (S.) et MAMOUNAS (N.). — *Bull. Soc. Chem. Biol.*, **32**, 529, 1950.

171 TANG (J.). — *Nature*, **199**, 4898, 1963.

172 TAYLOR (J.-F.). — *The Proteins*, Vol. I., p. 57, 1953.

173 THOMAS (D.-W.), MAC ALLISTER (R.-V.) et NIEMANN (C.). — *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1548, 1951.

174 TOENNIES (G.) et KOLB (J.-J.). — *Anal. Chem.*, **23**, 823, 1953.

175 TUPPY (H.). — *Monatsh. Chem.*, **84**, 996, 1953.

176 URIEL (J.). — *Nature*, **188**, 853, 1960.

177 URIEL (J.), WEBB (T.) et LAPRESLE (C.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **42**, 1285, 1960.

178 URIEL (J.), GRABAR (P.) et BURTIN (P.). — *L'analyse immunoélectrophorétique, ses applications aux milieux biologiques humains*, Masson Ed., Paris, 1960.

179 WALLER (J.-P.) et HARRIS (J.-I.). — *Proc. Nat. Ac. Sc.*, **47**, 18, 1961.

180 WALLER (J.-P.). — *J. Mol. Biol.*, **7**, 483, 1963.
181 WHITAKER (J.-R.). — *Anal. Chem.*, **35**, 1950, 1963.
182 WORK (E.). — *Ann. Inst. Pasteur*, **96**, 468, 1959.
183 YAMVRIAS (C.). — *Thèse Un. Fac. Sc.*, Paris, déc. 1961.
184 YOUNG (E.) et FITZ-JAMES (P.-C.). — *J. of Biophys. Biochem. Cyt.*, **6**, 467, 1960.
185 YOUNG (E.) et FITZ-JAMES (P.-C.). — *J. of Biophys. Biochem. Cyt.*, **6**, 483, 1960.
186 YOUNG (E.) et FITZ-JAMES (P.-C.). — *J. of Biophys. Biochem. Cyt.*, **6**, 499, 1960.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION ET HISTORIQUE 9

CHAPITRE I : Matériel et Techniques 17

A — Matériel 17

1 - Le chyle de *Pieris brassicae* 17

2 - Les cristaux de *B. thuringiensis* 18

a) Cultures 18

b) Séparation des cristaux 18

3 - Réactifs et produits utilisés pour l'étude des propriétés des enzymes 19

B — Techniques 20

1 - Détermination de l'activité enzymatique des préparations de *Pieris brassicae* 20

a) Dosages de protéases 20

b) Dosage de lyse des cristaux de *B. thuringiensis* 22

c) Dosage des protéines 23

d) Dosage de l'activité amidasique 24

e) Activité estérasique 24

2 - Techniques chromatographiques 25

3 - Technique d'ultracentrifugation 26

4 - Techniques d'électrophorèse 27

a) Sur gel d'amidon 27

b) Sur gélose 28

c) Finger-printing et révélations spécifiques 29

5 - Techniques d'étude des groupements N terminaux et C terminaux 30

6 - Dosage des oses totaux par la méthode à l'orcinol 31

7 - Techniques immunochimiques 31

a) Préparation des antisérums 31

b) Caractérisation des anticorps 32

1) Technique d'Ouchterlony 32

2) Immunoélectrophorèse sur gélose 32

8 - Dosages de toxicité sur les hydrolysats enzymatiques de cristaux 32

C — Liste des abréviations 34

CHAPITRE II : PURIFICATION DES PROTEASES DE *PIERIS BRASSICAE* 35

A — Purification 35
1 - Précipitation par le méthanol 35
2 - Fractionnement préliminaire sur Sephadex G-75 38
3 - Chromatographie sur échangeurs d'ions 39
a) Chromatographie sur échangeur d'anions .. 39
b) Chromatographie sur échangeur de cations 42
4 - Analyses d'ultracentrifugation sur les fractions 44

B — Propriétés communes aux deux enzymes 46
1 - Influence du pH sur l'activité enzymatique 46
2 - Stabilité 47
a) Stabilité en fonction du pH 47
b) Stabilité en fonction de la concentration en enzymes 48
3 - Action de la température 49
4 - Action de l'urée 52
5 - Action des ions métalliques 53
6 - Action de la cystéine et de différents inhibiteurs 55
7 - Action de l'inhibiteur de trypsine 56

C — Propriétés permettant de caractériser les deux enzymes 58
1 - Différenciation des protéases par leur action sur des substrats synthétiques 58
2 - Propriétés électrophorétiques 60
a) Gel d'amidon 60
b) Electrophorèse sur gélose et révélation spécifique de protéases 62
c) Caractérisation des protéases sur plaque de gélose par leur action sur les substrats synthétiques 64
3 - Propriétés immunochimiques 66
a) Analyse en milieu gélifié : Ouchterlony 66
b) Immunoélectrophorèse 68

CHAPITRE III : SPECIFICITE DES PROTEASES DE *PIERIS* 71

A — Hydrolyse des substrats synthétiques 73
1 - Expériences préliminaires 73
a) Conditions d'hydrolyse 73
b) Résultats 74
2 - Cinétique d'hydrolyse de différents substrats par chacune des protéases 75
a) Hydrolyse du CBZ-Phe-Phe par l'enzyme 1 75

b) Hydrolyse du BAA par l'enzyme 2 78
c) Vitesse d'hydrolyse de différents substrats par chacune des protéases 80
3 - Activité estérasique 81

B — Action des protéases sur des polypeptides de structure connue 82
1 - Hydrolyse du glucagon 83
a) Par l'enzyme 1 83
b) Par l'enzyme 2 84
2 - Hydrolyse de l'insuline 88
a) Par l'enzyme 1 88
2) Par l'enzyme 2 93
3 - Conclusions 93

C — Efficacité de l'association des deux enzymes : hydrolyse de l'insuline et des protéines natives 96
1 - Action simultanée des deux protéases sur l'insuline 96
2 - Hydrolyse d'une protéine native : l'albumine bovine 98

D — Conclusions 101

CHAPITRE IV : LE CRISTAL DE *B. THURINGIENSIS* 103

A — Quelques données sur la composition et la structure des cristaux 103
1 - Composition chimique des cristaux 104
a) Nature protéique des cristaux 105
b) Composition en acides aminés 107
2 - Solubilisation des cristaux : action des réducteurs de liaisons disulfure 108
a) Action des réducteurs : expériences quantitatives 109
b) Dosage des groupements -SH 114
c) Analyse des constituants de la dissolution .. 115
— Conditions de réduction d'alkylation 115
— Ultracentrifugation 116
— Electrophorèse sur gel d'amidon 117
— Détermination des groupements NH_2 terminaux 117

B — Hydrolyse enzymatique des cristaux par les protéases de *Pieris* 119
1 - Examen microscopique d'une préparation en cours de lyse 120
2 - Etude quantitative de la lyse enzymatique 125

3 - Composition des lysats enzymatiques 127
a) Fractionnement préliminaire du lysat sur Sephadex 75 127
b) Répartition des différents produits d'hydrolyse en fonction du degré d'hydrolyse 128
c) Composition de la fraction protéique du lysat 130
d) Composition de la partie peptidique du lysat 131
— Séparation sur Sephadex G-25 133
4 - Isolement de peptides et confirmation de la spécificité des enzymes 135
a) Chromatographie sur DEAE Sephadex A-25 135
b) Caractérisation des peptides 136
c) Conclusions relatives à la spécificité des protéases 138
5 - Toxicité des différentes fractions du lysat enzymatique 139
a) Toxicité comparée des fractions protéiques et peptidiques du lysat 139
b) Action de la température sur la toxicité 141
c) Estimation quantitative de la toxicité de la fraction protéique 142
d) Toxicité comparée des peptides isolés et de la fraction peptidique globale 143
e) Toxicité des produits résultant de la réduction des cristaux 144
C — Action des enzymes protéolytiques connus sur le cristal 145
1 - Action de la trypsine et de la chymotrypsine sur les cristaux à différents pH : dosage de lyse quantitatif 145
2 - Action comparée de plusieurs protéases sur les animaux natifs et dénaturés 147
Conclusions 150

DISCUSSION ET CONCLUSIONS 152

RESUME 161

BIBLIOGRAPHIE 163

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté :

« STRUCTURE FONDAMENTALE ET BIOSYNTHÈSE DES PAROIS DE BACTÉRIES GRAM POSITIVES. »

Vu et approuvé :
Paris, le 30 *juin* 1965
Le Doyen
de la Faculté des Sciences,
Marc ZAMANSKY

Vu et Permis d'imprimer :
Le Recteur
de l'Académie de Paris,
Jean ROCHE.

Au Manuscrit - Dépôt légal T - 1965 - 62